

BETÂNIA FRAGA PEREIRA

NOVAS ABORDAGENS NO PREPARO E NA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salvio Mangrich

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara Messerschmidt

CURITIBA

2004

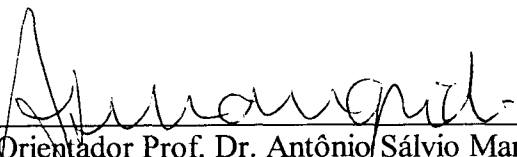
TERMO DE APROVAÇÃO

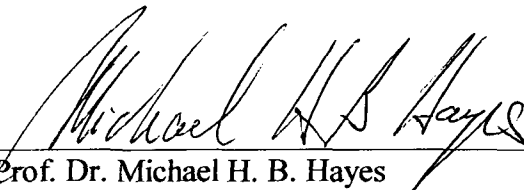
NOVAS ABORDAGENS NO PREPARO E NA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

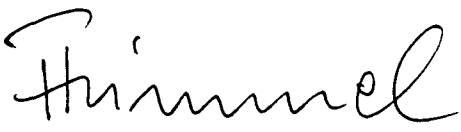
por

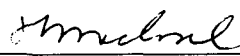
BETÂNIA FRAGA PEREIRA

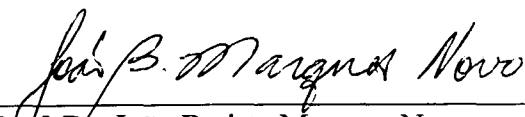
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:


Orientador Prof. Dr. Antônio Sálvio Mangrich
Deptº de Química – UFPR


Prof. Dr. Michael H. B. Hayes
Univ. Limerick - Irlanda


Prof. Dr. Fritz H. Frimmel
Univ. Karlsruhe- Alemanha


Profª. Drª. Sueli Maria Drechsel
Deptº de Química – UFPR


Prof. Dr. João Batista Marques Novo
Deptº de Química – UFPR

Curitiba, 06 de agosto de 2004.

Aos meus pais Sady e Almerinda, a quem tudo devo e serei eternamente grata, pelo exemplo de vida, amor, trabalho e dignidade.

“O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.
O que for o teu desejo, assim será tua vontade.
O que for a tua vontade, assim serão teus atos.
O que forem teus atos, assim será teu destino”.

Brihadaranyaka Upanishad IV, 4.5

AGRADECIMENTOS

A meus pais, por todo apoio, amor, abnegação, confiança, amizade e pela grande oportunidade de poder realizar o que desejo.

Ao Professor Dr. Antonio Salvio Mangrich, importante referencial, pela orientação, confiança, entusiasmo e tolerância inestimáveis.

À professora Dr^a. Iara Messerschmidt pela co-orientação, valiosa amizade, sugestões e inestimável disposição.

Ao Prof. Michael H. B. Hayes pela inestimável acolhida, compreensão, auxílio e estímulo no período de Doutorado-Sanduiche na Universidade de Limerick, UL, Irlanda.

A vocês Prof. Mangrich, Profa. Iara e Prof. Michael, especialmente pelos ensinamentos sobre a vida, vocês são grandes referenciais.

A Prof^a. Dr^a. Sueli Maria Drechsel, ao Prof. Dr. João Batista Marques Novo e ao Prof. Dr. Patrício Guillermo Peralta Zamora pela inestimável colaboração, ensinamentos, sugestões e gentileza em aceitar participar da Banca Examinadora de Qualificação.

A Prof^a. Dr^a. Sueli Maria Drechsel, ao Prof. Dr. João Batista Marques Novo, ao Prof. Dr. Michael H. B. Hayes e Prof. Dr. Fritz Frimmel pelas discussões, sugestões e gentileza em aceitar o convite para participar da Banca de exame final de Doutorado.

Aos colegas e amigos Volnei Pauletti e ao Costa da Fundação ABC, Castro Paraná pela inestimável ajuda na coleta e preparação dos solos aqui estudados.

Ao Prof. Dr. Harley Martin, pela realização dos gráficos de superfície de resposta.

Ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná.

A CAPES, ao CNPq e ao EPA (Environmental Protection Agency – European Community) pelas bolsas concedidas.

Aos docentes e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Química e do Centro de Ciências do Meio Ambiente (UL) por todos os ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Química e do CES (Center of Environmental Science/UL, Irlanda) que tornaram este período extremamente prazeroso.

Aos colegas do LABPAM, Ademar, Cláudia, Cristiane, Elisete, Fabinho, Jeniffer, Kátia, Ísis, Júlio, Rodrigo, Ronei e Tatiane, por todo apoio, colaboração, paciência e amizade.

Aos colegas Belen, Jesus, Silvia, Giacommo, Simon, Ray, James e Liam, grandes amigos e companheiros que tornaram o período de trabalho na Irlanda muito mais prazeroso, por todo apoio, incentivo e carinho.

A Danyella, Kátia e Marcelo Nolasco, pelo agradável convívio neste período.

Aos grandes amigos Kátia, Iara, Jeane, Mariana, Marcelo Lima e Melissa.

As grandes amigas Lourdes, Iara, Gia e Josi que me mostraram que novas amizades são um presente divino.

Ao Ademar, Fabinho e ao Liam (UL), alunos de IC que foram essenciais na elaboração deste trabalho.

A Cristiane e a Elisete, que foram muito mais do que simples colegas, pelo auxílio na finalização deste trabalho.

A Elisete, querida colega e amiga que me auxiliou em momentos difíceis. O seu carinho foi essencial.

Ao Fabinho, “magnânimo” amigo, que sempre esteve presente com seu sorriso aberto, seu auxílio foi primordial na realização deste trabalho.

A minha família, onde encontro apoio e estímulo para prosseguir, com a certeza de que nunca estarei sozinha.

SUMÁRIO

<i>SUMÁRIO</i>	vi
<i>ÍNDICE DE TABELAS</i>	x
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	xii
<i>LISTA DE ABREVIATURAS *</i>	xvii
<i>RESUMO</i>	xviii
<i>ABSTRACT</i>	xx
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 INTRODUÇÃO - INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO	4
1.1.1 Caracterização do Resíduo	5
1.1.1.1 Lodo Biológico	5
1.1.1.2 Características do Lodo Biológico	5
1.1.2 Importância da Caracterização do Lodo Biológico	8
1.1.3 O Nutriente Nitrogênio e os Fertilizantes de Liberação Lenta	8
1.1.4 O Processo Nitração/Oxidação	11
1.1.4.1 Processo Nitração/Oxidação de Compostos Orgânicos	13
1.1.5 O Processo Redução de Compostos Orgânicos Nitrados	15
1.2 INTRODUÇÃO - EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO	16
1.2.1 Classificação da Matéria Orgânica de Solo	17
1.2.2 Definições Básicas de Substâncias Húmicas	18
1.2.3 Formação das Substâncias Húmicas	19
1.2.4 Estrutura e Propriedades Químicas das Substâncias Húmicas	22
1.2.5 Distribuição das Substâncias Húmicas	23
1.2.6 Extração, Isolamento e Fracionamento de Substâncias Húmicas de Solo usando Extratores Aquosos a diferentes pH e Resinas XAD	25
1.2.6.1 Extração de Substâncias Húmicas	25
1.2.6.1.1 Filtro de Tamanho de Poro Controlado	29
1.2.6.2 Isolamento e Fracionamento de Substâncias Húmicas utilizando Resinas XAD	30
1.3 INTRODUÇÃO - PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE DADOS	34
1.3.1 Planejamento Fatorial 2^3	35
1.3.2 Planejamento em Estrela	37
1.3.3 Cálculo dos Efeitos e Interações	38
1.3.4 Superfície de Resposta	39
1.4 INTRODUÇÃO - MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	40
1.4.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	40
1.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)	41

1.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Reflectância Difusa (DRIFT)	41
1.4.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-VIS).....	43
1.4.4 Análise Elementar de C H N S.....	44
1.4.5 Análises Quimiométricas.....	44
2 OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo específico 1. Preparação de lodo biológico nitrado/reduzido como FLLN	48
2.2 Objetivo específico 2. Extração, isolamento e fracionamento de SH de solo sob diferentes manejos	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS – INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO	50
3.1.1 Nitração/Oxidação.....	50
3.1.2 Redução	51
3.1.3 Planejamento e Otimização dos Dados	52
3.1.3.1 Planejamento Fatorial 2 ³	52
3.1.3.2 Cálculo dos Efeitos e Interações	53
3.1.3.3 Análise por meio de Gráficos Normais.....	55
3.1.3.4 Planejamento em Estrela.....	55
3.1.3.5 Superfície de Resposta.....	57
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS – EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO	57
3.2.1 Solo.....	57
3.2.2 Equipamentos, materiais e reagentes.....	58
3.2.2.1 Filtração	59
3.2.2.2 Colunas	59
3.2.3 Preparação da resina XAD.....	59
3.2.4 Procedimento de extração usado no isolamento de substâncias húmicas de solo.....	62
3.2.5 Fracionamento das substâncias húmicas seguindo uma modificação do procedimento sugerido pela IHSS	63
3.2.5.1 Diálise dos AH	64
3.2.6 Isolamento de frações húmicas usando as resinas XAD-8 e XAD-4 no procedimento em “tandem”	64
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS - MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	66
3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	66
3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T) e DRIFT.....	67
3.3.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis).....	67
3.3.4 Análise Elementar de C H N S.....	67
3.3.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³ C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (¹³ C CPMAS NMR).....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO – INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO	69
4.1.1 Planejamento e Otimização dos Dados para Nitração.....	69
4.1.1.1 Planejamento Fatorial 2 ³	69
4.1.1.1.1 Planejamento Fatorial 2 ³ - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	69
4.1.1.1.1.1 Planejamento Fatorial 2 ³ - Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada a EPR	76
4.1.1.1.2 Planejamento Fatorial 2 ³ - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T)	78
4.1.1.1.2.1 Planejamento Fatorial 2 ³ - Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada a FTIR por Absorbância.....	84
4.1.1.1.2.2 Planejamento Fatorial 2 ³ - Cálculo dos Efeitos e Interações	88
4.1.1.1.2.3 Planejamento Fatorial 2 ³ - Superfície de Resposta	92
4.1.1.1.3 Planejamento Fatorial 2 ³ - C, H, N, S	96
4.1.1.2 Planejamento em Estrela para Nitração	96
4.1.1.2.1 Planejamento em Estrela - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	97
4.1.1.2.2 Planejamento Estrela - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T)	100
4.1.1.2.2.1 Planejamento em Estrela - Superfície de Resposta.....	102
4.1.1.2.3 Planejamento em Estrela - C, H, N, S.....	105
4.1.2 Redução	106
4.1.2.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	106
4.1.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T).....	109
4.1.3 Nitração/Redução	110
4.1.3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Absorbância (T)	111
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO.	113
4.2.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO - COMPARAÇÃO DE pH DE EXTRAÇÃO DE AH DE CAMPO NATIVO COM FRACIONAMENTO UTILIZANDO XAD-8 E SEM FRACIONAMENTO UTILIZANDO XAD-8	113
4.2.1.1 AH de Campo Nativo - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	116
4.2.1.2 AH de Campo Nativo - Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-VIS)	126
4.2.1.3 AH de Campo Nativo - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T).....	129
4.2.1.4 AH de Campo Nativo - Análises Multivariadas.....	136
4.2.1.5 AH de Campo Nativo - Conclusões Parciais	138
4.2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO - COMPARATIVO DE AH E AF DE FLORESTA.....	140
4.2.2.1 AH e AF de Floresta	140

4.2.2.2 AH e AF de Floresta - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	141
4.2.2.3. AH e AF de Floresta - Análises Multivariadas	146
4.2.2.4. AH e AF de Floresta – Conclusões Parciais	153
4.2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO - NOVA METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO DE SH DE SOLO - PLS APLICADO ÀS ANÁLISES DE DRIFT E EPR “VERSUS” NMR	155
4.2.3.1 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) por Reflectância Difusa (DRIFT).....	155
4.2.3.2 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	158
4.2.3.3 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C CPMAS NMR)	159
4.2.3.4 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Análises Multivariadas	163
4.2.3.5 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Conclusões Parciais	176
5 CONCLUSÕES.....	177
5.1 CONCLUSÕES PARCIAIS – INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO	177
5.2 CONCLUSÕES PARCIAIS – EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO	179
5.3 CONCLUSÕES FINAIS	180
5.4 PERSPECTIVAS DE TRABALHO	181
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	182

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1: Análise de fertilidade do substrato lodo biológico.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabela 2: Estimativa das reservas orgânicas de carbono em diferentes reservatórios (Hayes e colaboradores, 2001, 1989).....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 3: Vantagens e desvantagens de filtros de diferentes matrizes usados na filtração de materiais extraídos para posterior isolamento de substâncias húmicas de solo e aquáticas (Aiken, 1985).....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 4: Propriedades das resinas XAD (Aiken, 1985).....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 5: Resultados do planejamento fatorial 2³ - Fatores</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 6: Resultados do planejamento fatorial 2³ – Nível superior e inferior.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 7: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial 2³</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 8: Matriz de planejamento dos ensaios baseados no planejamento fatorial 2³</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 9: Coeficientes de contraste para um fatorial 2³</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 10: Fatores e níveis estudados no planejamento em estrela.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 11: Matriz dos ensaios no planejamento em estrela.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 12: Concentração de radicais livres orgânicos (RLO) observados por EPR nas amostras de lodo biológico puro, nitrado e reduzido estudadas</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 13: Números de onda (cm⁻¹) de interesse para o cálculo das áreas das amostras estudadas.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabela 14: Resultados do planejamento fatorial 2³ a partir das áreas calculadas para as regiões de NO₂ (1581-1485 cm⁻¹) e COOH+COO⁻ (1861-1573 cm⁻¹) dos espectros de FTIR</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 15: Cálculo dos Efeitos e Interações utilizando as áreas nas regiões de FTIR, como resposta das nitrações</i>	<i>91</i>
<i>Tabela 16: Matriz de dados da região de grupos nitro para os gráficos de superfície de resposta, planejamento fatorial.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabela 17: Matriz de dados da região de grupos carboxílicos e carboxilatos para os gráficos de superfície de resposta, planejamento fatorial.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabela 18: Análise elementar (C, H, N, S e O) em % e razões atômicas para as amostras lodo biológico (N1), as nitrações (N2 a N10) e a redução com SnCl₂ (N11) do planejamento fatorial 2³</i>	<i>96</i>
<i>Tabela 19: Matriz de planejamento dos ensaios baseados no planejamento estrela</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 20: Concentração de radicais livres orgânicos (RLO) observados por EPR nas amostras estudadas do planejamento em estrela.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 21: Resultados do planejamento estrela para as áreas calculadas a partir dos espectros de FTIR.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabela 22: Matriz de dados da região de grupos nitro para os gráficos de superfície de resposta, planejamento em estrela</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 23: Matriz de dados da região de grupos carboxílicos e carboxilatos para os gráficos de superfície de resposta, planejamento em estrela</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 24: Análise elementar (C, H, N, S e O) e razões atômicas para as amostras do planejamento em estrela</i>	<i>105</i>
<i>Tabela 25: Concentração de radicais livres orgânicos (RLO) observados por EPR nas amostras estudadas.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabela 26: Resultados do planejamento estrela para as áreas calculadas a partir dos espectros de FTIR das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9).....</i>	<i>110</i>

<i>Tabela 28: Áreas calculadas a partir dos espectros de FTIR do lodo biológico nitrado/reduzido em processo contínuo.....</i>	<i>112</i>
<i>Tabela 29: AH extraídos a diferentes valores de pH</i>	<i>113</i>
<i>Tabela 30: Concentração de Radicais Livres Orgânicos (RLO) nas amostras de AH extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados em resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente</i>	<i>126</i>
<i>Tabela 31: Relações E2/E4 (Absorbância em 270 nm/Absorbância em 407 nm) e E4/E6 (Absorbância em 465 nm/Absorbância em 665 nm) dos AH extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados em resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente.....</i>	<i>128</i>
<i>Tabela 32: Atribuições das bandas de FTIR para AH extraídos de solo sob campo nativo a diferentes pH de extração</i>	<i>133</i>
<i>Tabela 33: AH e AF de solo sob floresta extraídos a diferentes pH e isolados utilizando a resina XAD-8.....</i>	<i>141</i>
<i>TABELA 34: Valores de RLO em número de spins g⁻¹ dos AH e AF estudados.....</i>	<i>158</i>
<i>Tabela 35: Atribuições químicas do deslocamento (ppm) para as principais regiões dos espectros de ¹³C CPMAS NMR e sua abundância relativa (%) para as amostras de AH e AF extraídas a pH 7,6 e 12,6</i>	<i>162</i>
<i>Tabela 36: Correlação linear (R) entre os valores previstos dos grupamentos de ¹³C NMR, pelo modelo PLS, com três variáveis latentes e os valores reais obtidos por ¹³C NMR (% de grupamentos).....</i>	<i>163</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura dos álcoois precursores de ligninas.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2. Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 3: Fragmento da estrutura proposta para a lignina do Eucalyptus grandis, segundo Morais (1992).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 4: Seqüência da oxidação de lodo biológico com formação de ácidos orgânicos progressivamente menores (adaptado de Manahan e colaboradores - 1978)</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5: Representação esquemática da teoria da lignina na formação do húmus (Stevenson, 1994).....</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 6: Componentes estruturais da resina XAD-8 (éster acrílico) usadas no isolamento de SH (Aiken, 1985)</i>	<i>33</i>
<i>Figura 7: Interpretação geométrica dos efeitos em um planejamento 2³</i>	<i>36</i>
<i>Figura 8: Planejamento em estrela para duas variáveis codificadas.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 9: Estrutura do composto modelo ácido 5-nitrosalicílico (5-NSA).....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 10: Visão panorâmica das áreas coletadas para a análise</i>	<i>58</i>
<i>Figura 11: Procedimento seqüencial de extração usando solventes aquosos a diferentes valores de pH usado no isolamento e fracionamento das SH.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 12: Espectros de EPR das amostras estudadas a 5000 G a 300 K.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 13: Espectros de EPR das amostras estudadas a 5000 G a 77K.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 14: Espectros de EPR das amostras estudadas a 30 G a 300 K.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 15: Espectros de EPR das amostras a 50 G a 77 K em 2ª derivada*</i>	<i>73</i>
<i>Figura 16: Espectros de EPR da amostra pura a 5000 G em temperatura ambiente (TA) (N1TA) e 77 K (N177).....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 17: Espectros de EPR da amostra nitrada a 5000 G em temperatura ambiente (TA) (N2TA) e a 77 K (N277).....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 18: Espectros de EPR da amostra nitrada e reduzida a 5000 G em temperatura ambiente (TA) (N2RETA) e a 77 K (N2RE77)</i>	<i>75</i>
<i>Figura 19: Espectros de EPR da amostra nitrada e reduzida a 50 G em temperatura ambiente (TA) (N2RETA) e a 77 K (N2RE77)</i>	<i>76</i>
<i>Figura 20: Planejamento 2³ - Análise de componentes principais (PCA) aplicada a EPR às amostras obtidas a partir dos ensaios do planejamento 2³</i>	<i>77</i>
<i>Figura 21: Espectros por transmitância (T) da média das 6 repetições com o ácido 5NSA e a amostra pura do lodo biológico.</i>	<i>79</i>
<i>Figura 22: Espectros de FTIR em absorbância (A) das amostras do lodo biológico (N1) e nitrações.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 23: Espectros por transmitância (T) das amostras lodo biológico (N1), nitrada com 1 mol L⁻¹, 6 horas, 40^oC (N2) e reduzida com SnCl₂ (N11).....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 24: Correlação entre as áreas de ϕ-NO₂ (1581-1485 cm⁻¹) e ϕ-COOH + COO⁻ (2300-1861 cm⁻¹)</i>	<i>83</i>
<i>Figura 25: Correlação entre as áreas de ϕ C-O (carboidrato) (2300-1861 cm⁻¹) e ϕ C-H (alifático) (3001-2750 cm⁻¹).....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 26: "Scores" para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros em absorbância (A) das amostras estudadas.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 27: "Scores" para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros das amostras estudadas na região de 1581 a 1485 cm⁻¹ (grupos NO₂) em absorbância (A).....</i>	<i>86</i>

Figura 28: “Scores” para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros das amostras estudadas na região de 1861 a 1573 cm ⁻¹ (COOH + COO ⁻) em absorbância (A).....	87
Figura 29: “Scores” para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros das amostras estudadas na região de 3001 a 2750 cm ⁻¹ (C-H alifáticos) em absorbância (A).....	88
Figura 30: Região de 1581 – 1485 cm ⁻¹ (Grupos NO ₂) (A) e região de 1861-1573 cm ⁻¹ (COOH+COO ⁻) (B) dos espectros em absorbância (A) de FTIR das amostras do planejamento fatorial 2 ³ utilizadas para o cálculo das áreas.....	89
Figura 31: Gráficos de efeito versus probabilidade cumulativa para as regiões de grupos nitro (a), carboxílicos e carboxilatos (b).....	92
Figura 32: Superfícies de respostas de otimização do processo de nitratação/oxidação - planejamento fatorial 2 ³ para a região de absorção de NO ₂ em 2 dimensões (a) e em 3 dimensões (b).....	94
Figura 33: Superfícies de respostas de otimização do processo de nitratação/oxidação - planejamento fatorial 2 ³ para a região de absorção de COOH + COO ⁻ em 2 dimensões (a) e em 3 dimensões (b).....	95
Figura 34: Espectros de EPR das amostras estudadas a 5000 G a temperatura ambiente do planejamento em estrela	99
Figura 35: Espectros de EPR das amostras estudadas a 50 G a temperatura ambiente do planejamento em estrela	99
Figura 36: Espectros de FTIR em absorbância (A) das amostras dos planejamentos em estrela obtidos em triplicata.....	101
Figura 37: Região de 1581 – 1485 cm ⁻¹ (Grupos NO ₂) (A) e região de 1861-1573 cm ⁻¹ (COOH+COO ⁻) (B) dos espectros de FTIR em absorbância (A) das amostras do planejamento em estrela utilizadas para o cálculo das áreas	101
Figura 38: Superfície de resposta de otimização do processo de nitratação/oxidação - planejamento em estrela para a região de absorção de NO ₂ em 2 dimensões (a) e em 3 dimensões (b).....	103
Figura 39: Superfície de resposta de otimização do processo de nitratação/oxidação - planejamento em estrela para a região de absorção de COOH + COO ⁻ em 2 dimensões (a) e em 3 dimensões (b).....	104
Figura 40: Espectros de EPR das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9) estudadas a 5000 G a temperatura ambiente.....	108
Figura 41: Espectros de EPR das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9) estudadas a 50 G a temperatura ambiente	108
Figura 42: Espectros de FTIR em absorbância (A) das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9) cortadas, alisadas e normalizadas.....	109
Figura 43: Espectros de FTIR por absorbância (A) cortados, alisados e normalizados, da amostra nitrada/reduzida em processo contínuo: pura, nitrada e reduzida	111
Figura 44: Espectros de EPR a 5000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8	116
Figura 45: Espectros de EPR a 2000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8	116
Figura 46: Espectros de EPR a 600G, em segunda derivada em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8, detalhe do Mn ²⁺ *	117

<i>Figura 47: Espectros de EPR a 50G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8.....</i>	<i>117</i>
<i>Figura 48: Espectros de EPR a 100G, em TA, em segunda derivada das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8, detalhe da interação Cu - N.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 49: Espectros de EPR a 5000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 50: Espectros de EPR a 2000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 51: Espectros de EPR a 5000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 52: Espectros de EPR a 2000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8.....</i>	<i>120</i>
<i>Figura 53: Espectros de EPR a 100G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8, detalhe da interação Cu-N.....</i>	<i>120</i>
<i>Figura 54: Espectros de EPR a 50G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 55: Espectros de EPR a 5000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 56: Espectros de EPR a 2000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 57: Espectros de EPR a 5000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 58: Espectros de EPR a 2000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>123</i>
<i>Figura 59: Espectros de EPR a 600G, a TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>123</i>
<i>Figura 60: Espectros de EPR a 50G, a TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>124</i>
<i>Figura 61: Espectros de EPR a 5000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>124</i>
<i>Figura 62: Espectros de EPR a 2000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8.....</i>	<i>125</i>
<i>Figura 63: Espectros de Ultravioleta - visível em estado sólido das amostras de ácidos húmicos extraídos a pH 7,6, isolados utilizando-se a resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente.....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 64: Espectros de Ultravioleta - visível em estado sólido das amostras de ácidos húmicos extraídos a pH 10,6, isolados utilizando-se a resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente.....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 65: Espectros de Ultravioleta - visível em estado sólido das amostras de ácidos húmicos extraídos a pH 12,6, isolados utilizando-se a resina XAD8 e/ou liofilizados diretamente.....</i>	<i>128</i>
<i>Figura 66: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos ácidos húmicos (AH) de campo nativo extraídos a pH 7,6, isolados utilizando-se resina XAD-8 (AH 12) e/ou liofilizados diretamente.....</i>	<i>134</i>
<i>Figura 67: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos AH de campo nativo extraídos a pH 10,6, isolados utilizando-se resina XAD-8 e liofilizados diretamente.....</i>	<i>134</i>

Figura 68: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos AH de campo nativo extraídos a pH 12,6, isolados utilizando-se resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente..	135
Figura 69: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos ácidos húmicos (AH) de campo nativo extraídos a pH 7,6; 10,6 e 12,6 e isolados utilizando-se resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente.....	135
Figura 70: Espectros de FTIR de AH na região de 3500 - 400 cm^{-1} , pré-processados com tratamento MSC, centrados na média e alisados em 13 pontos	136
Figura 71: “Loadings” para a 1ª, 2ª e 3ª CP para os dados de FTIR dos AH, na região de 1900 - 400 cm^{-1}	137
Figura 72: “Scores” para a 2ª CP versus a 3ª CP versus a 1ª CP para os dados de FTIR dos AH.....	138
Figura 73: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AF de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8.....	143
Figura 74: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AF de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8 - detalhe da região de RLO	143
Figura 75: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AH de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com e sem o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8.....	145
Figura 76: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AH de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com e sem o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8 – detalhe da região de RLO	145
Figura 77. “Loadings” para a 1ª, 2ª, 3ª, e 4ª CP para os dados de EPR dos AF de Floresta	147
Figura 78: “Loadings” para a 1ª, 2ª, 3ª, e 4ª CP para os dados de EPR dos AF de Floresta – detalhe da região de RLO	147
Figura 79: “Scores” para a 1ª CP versus a 2ª CP (A), para a 1ª CP e 3ª CP (B) e para a 2ª CP e 3ª CP (C) para os dados de EPR dos AF.....	148
Figura 80: “Loadings” para a 1ª, 2ª e 3ª CP para os dados de EPR dos AH de Floresta	150
Figura 81: “Loadings” para a 1ª, 2ª 3ª e 4ª CP para os dados de EPR dos AH de Floresta – detalhe da região de RLO	151
Figura 82: “Scores” para a 1ª CP versus a 2ª CP (A), para a 1ª CP e 3ª CP (B) e para a 2ª CP versus a 3ª CP (C) para os dados de EPR dos AH	152
Figura 83: Espectros no infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier (DRIFT) de AH e AF extraídos a pH 7,6 e pH 12,6, na região de 6500 - 400 cm^{-1} , pré-processados com alisamento, com correção do fator multiplicativo (MSC) e centrados na média.....	156
Figura 84: Espectros de EPR a 77 K (0 - 5000 G) de AH e AF extraídos a pH 7,6 e 12,6, pré-processados com normalização e centrados na média.....	158
Figura 85: Espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C CPMAS NMR) para os AH e AF extraídos de solos de Floresta, Plantio Direto e Campo Nativo a diferentes pH.....	161
Figura 86: Correlação linear (R) entre os valores previstos dos grupamentos de ^{13}C NMR, pelo modelo PLS (matriz X – DRIFT) , com três variáveis latentes e os valores reais obtidos por ^{13}C NMR (% de grupamentos alifáticos - A, aromáticos - B e COOH/CON - C)	164
Figura 87: Correlação linear (R) entre os valores previstos dos grupamentos de ^{13}C NMR, pelo modelo PLS (matriz X – EPR), com três variáveis latentes e os valores reais obtidos	

por ^{13}C NMR (% de grupamentos alifáticos - A, aromáticos - B e COOH/CON - C) para EPR.....	165
Figura 88: "Loadings" da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL), para o modelo PLS, dos dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos aromáticos nos espectros de ^{13}C NMR)] e espectros de DRIFT das amostras de ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) extraídos de solos sob diferentes manejos.	166
Figura 89: "Loadings" da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos COOH/CON nos espectros de ^{13}C NMR)] e os espectros de DRIFT dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solos sob diferentes manejos.	168
Figura 90: "Loadings" da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos alifáticos nos espectros de ^{13}C NMR)] e os espectros de DRIFT dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solos sob diferentes manejos.	170
Figura 91: "Loadings" da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos aromáticos nos espectros de ^{13}C NMR)] e espectros de EPR (0 - 5000 G - A e ~ 2000 - 3500 G - B) dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solo sob diferentes manejos.	171
Figura 92: "Loadings" da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos COOH/CON nos espectros de ^{13}C NMR)] e espectros de EPR (0 - 5000 G - A e ~ 2000 - 3500 G - B) dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solo sob diferentes manejos.	173
Figura 93: "Loadings" da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos alifáticos nos espectros de ^{13}C NMR)] e espectros de EPR (0 - 5000 G - A e ~ 2000 - 3500 G - B) dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solo sob diferentes manejos...	174

LISTA DE ABREVIATURAS *

AF = ácido fúlvico
AH = ácido húmico
C/N = relação carbono / nitrogênio
CP = componente principal
DRIFT = espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier por reflectância difusa
E4/E6 = razão entre absorbâncias a 465 nm e 665 nm no UV-VIS
EPR = ressonância paramagnética eletrônica
FLLN = fertilizante de liberação lenta de Nitrogênio
FTIR = espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
G = Gauss (unidade de campo magnético) = 10^{-4} T (Tesla)
IHSS = "International Humic Substances Society"
HU = húmus
IR-120 = resina trocadora de cátions (estireno divinil benzeno com funcionalidade ácida sulfônica)
MO = matéria orgânica
MOS = matéria orgânica do solo
MSC = correção do fator multiplicativo do sinal
N/C = relação nitrogênio / carbono
NMR = ressonância magnética nuclear
PCA = análise de componentes principais
RLO = concentração de radicais livres
SH = substância húmica
T = transmitância
UV-VIS = espectroscopia no ultravioleta-visível
XAD = resina composta por polímeros não aniônicos, macroporosos de grandes áreas superficiais.

* Algumas abreviaturas foram mantidas dos nomes em inglês devido às popularidades adquiridas.

RESUMO

Os resíduos orgânicos podem servir como fertilizantes em solos pobres em matéria orgânica devido ao alto conteúdo nutricional para as plantas e às propriedades de condicionamento dos solos. O nitrogênio é o nutriente cuja perda é mais provável através de lixiviação, e esta se dá na forma de NO_3^- , por sua fraca aderência às estruturas químicas do solo. Neste contexto, é de grande importância para a agroindústria um resíduo rico em nitrogênio, com este elemento ligado covalentemente (um fertilizante de liberação lenta de nitrogênio - FLLN), que proporcione uma menor perda de nitrato ao lençol freático e perda de produtividade. Dentre os efeitos decorrentes da degradação do solo são de particular importância e complexidade aqueles associados à matéria orgânica do solo (MOS), visto que alterações na quantidade e qualidade desta, podem ocorrer em função das práticas de manejo do solo. Apesar disto, após mais de dois séculos de estudos, a dinâmica, reações e características químicas da matéria orgânica do solo permaneçam pouco elucidadas. Para se estudar o húmus este deve ser separado do material não húmico. Para isso, este pode ser fracionado quimicamente em substâncias húmicas (SH). A elucidação das estruturas das SH vem a contribuir no entendimento da dinâmica destas com o meio ambiente, o que é bastante discutido hoje em dia em termos de seqüestro de carbono e aquecimento global (Hayes e Malcom, 2001). Um grande número de técnicas químicas e, em especial, as espectroscópicas [ressonância paramagnética eletrônica (EPR), ressonância magnética nuclear (NMR) em estado sólido, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa (DRIFT), espectroscopia no ultravioleta visível (UV-VIS) de amostra sólida, dentre outras], têm sido usadas na identificação, composição e estrutura de resíduos agroindustriais, bem como das substâncias húmicas (Budziak e colaboradores, 2004). A caracterização destas amostras pode gerar um grande número de variáveis. Neste sentido, o modelo estatístico de métodos multivariados considera a correlação entre estas variáveis permitindo a extração de uma quantidade maior de informações além de separar as informações importantes das redundantes. Neste contexto, tanto o estudo de metodologias que minimizem os impactos causados pela má disposição de resíduos industriais, bem como o estudo das substâncias húmicas presentes nos solos, são de fundamental importância em se tratando de preservação de meio ambiente bem como do entendimento da atividade destas substâncias nos ambientes. Um dos objetivos deste estudo foi o de através de metodologia de oxidação/nitração, com HNO_3 , agregar valor fertilizante ao resíduo lodo biológico de fábrica de celulose; reduzir os grupos NO_2 do lodo nitrado a amina, com a finalidade de aumentar a variedade de grupos ligantes no futuro FLLN; caracterizar o lodo biológico, o lodo nitrado, o lodo nitrado e reduzido, por espectroscopia de EPR, por FTIR, por UV-VIS, e por análise elementar (C, H, N) e analisar os dados obtidos por métodos quimiométricos. Outro objetivo deste trabalho foi o de extrair, isolar e caracterizar, por análises químicas e espectroscópicas, as substâncias húmicas de solo sob diferentes manejos (campo nativo, plantio direto e floresta), utilizando metodologia de extração exaustiva (três extrações a cada pH) e seqüencial com solventes aquosos (pirofosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a diferentes pH (7,6, 10,6 e 12,6); analisar os dados obtidos por métodos quimiométricos (PCA e PLS) e aplicar o método PLS como método de regressão e avaliar as correlações entre as técnicas espectroscópicas EPR, DRIFT e ^{13}C NMR, nas amostras de AH e AF, de modo a prever os resultados de ^{13}C NMR por EPR e/ou DRIFT. Os resultados mostram que foi possível, em escala de laboratório, produzir fertilizante de liberação lenta de N, a partir de lodo biológico das lagoas de decantação das indústrias de celulose. Empregando-se o método da extração seqüencial e exaustiva em diferentes pH, de SH de solo, promoveu-se maior entendimento das estruturas das SH de solo. Este método é

extremamente trabalhoso e inédito no estudo de solos brasileiros. Foi proposta e desenvolvida também, metodologia para caracterizar interações entre as frações inorgânicas e orgânicas em SH de solo, submetido a diferentes tipos de manejo. Uma característica complicadora no estudo das SH dos solos brasileiros diz respeito ao alto teor de Fe^{3+} , que muitas vezes torna impossível a análise por NMR. Assim, ao desenvolvermos esta nova metodologia, tomamos a caracterização das SH mais viáveis técnica e economicamente.

ABSTRACT

In terms of the high nutritional content for plants and of the soil conditioning properties, organic residues can serve as fertilizing in soils poor in organic matter. Leaching is the most likely way of nitrogen losses. It happens in the NO_3^- form, because of its weak link to the chemical structures of the soil. In this context, a residue rich in nitrogen is of great importance for the agro industry, with this element covalently linkage (a slow release fertilizer - SRF), that it provides less losses of nitrate ion to the underground waters and of productivity. Among the degradation's effect those associates to the soil organic matter (SOM). However, two centuries after, the study of the dynamic, reactions and chemical characteristics of the SOM remains a little elucidated. For the humus study, it must be separated from the non-humic material. For this, it can be chemically fractionated in humic substances (HS). The structures HS elucidation contributes to the dynamic agreement of these HS with the environment, which is quite discussed nowadays in terms of carbon sequestration and global heating. Several chemical and spectroscopy techniques, in special, the spectroscopic [electronic paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance (NMR) in solid state, infrared with Fourier Transformed by diffuse reflectance (DRIFT) and ultraviolet-visible (UV-VIS) in solid sample, among others], it has been used to identify the composition and the structure of agro-industry wastes, as well as, HS. The characterization of those samples can generate a great number of variables. In this way, the statistical models of multivariate methods consider the correlation among those variables allowing the extraction of higher amount information, as well as to separate important information from the redundant ones. In this context, both the methodology study that minimize the wrong disposal impact of industrial residues and the study of soil HS are important in terms of environment preservation, as well as the understanding of these substances activity in the environment. One of the objectives of this study was of through the oxidation/nitration methodology, using HNO_3 , to add fertilizing value to the biological sludge waste of cellulose factory; to reduce NO_2 groups of the nitrated sludge to amine, with the purpose to increase the variety of ligands groups in the SRF; to characterize the pure biological sludge, the nitrated sludge, the nitrated and reduced sludge by EPR, FTIR, UV-VIS spectroscopy, and elementary analysis (C, H, N); and to analyze the data by chemometric methods. Other objective of this work was to extract, isolate and characterize, by chemical and spectroscopic analyses, the soil HS under different managements (native field, low tillage and forest), using exhausting and sequential extraction methodology (three extractions at each pH) with solvent (sodium pyrophosphate 0.1 mol L^{-1} and sodium hydroxide 0.1 mol L^{-1}) at different pH (7.6, 10.6 and 12.6); to analyze the data by chemometric methods (PCA and PLS) and to apply the PLS method as a regression method evaluating the correlation between the spectroscopic techniques (EPR and DRIFT and ^{13}C NMR), in the samples of HA and FA, in order to foresee the results of ^{13}C NMR by EPR and/or DRIFT. The results showed that it is possible, in laboratory scale, to produce SRF of nitrogen, from biological sludge of cellulose industry. The application of the sequential and exhausting extraction methodology at different pH, in soil HS, promoted a better understanding of the soil HS structures. This methodology is extremely laborious and time consuming and it is new in terms of Brazilian soil study. It was proposed and also developed, methodology to characterize interactions inorganic - organic in soil HS, submitted to different managements. A difficult topic in terms of the study of the Brazilian soil HS is regards to the high content of Fe^{3+} ion that turns impossible the analysis by NMR. Thus, the development of this new methodology turns the HS characterization most viable in economic and technique terms.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos 30 anos, vários estudos realizados com diferentes resíduos orgânicos têm confirmado o potencial desses materiais em aumentar a produtividade das culturas em geral (Guimarães e colaboradores, 1997). Devido ao alto conteúdo nutricional para as plantas e às propriedades de condicionamento dos solos, os resíduos orgânicos podem servir como fertilizantes em solos florestais com deficiência nutricional ou pobre em matéria orgânica. Os resíduos orgânicos, aplicados em taxas aceitáveis pelo meio ambiente, resultam em respostas de crescimento para as plantas. Um programa de cultivo que utilize resíduos orgânicos deve ser executado usando técnicas de manejo que não resultem em danos ambientais. Análises do risco em áreas não agrícolas (incluindo florestas), sugerem que os contaminantes presentes em resíduos orgânicos oferecem riscos insignificantes para os seres humanos e o meio ambiente quando utilizados apropriadamente, uma vez que os resíduos industriais têm melhorado muito nos últimos 30 anos em função de exigências legais. No entanto, as taxas de aplicação não devem exceder à capacidade do sistema de utilizar e reter os nutrientes aplicados, sob pena de ocorrerem perdas por lixiviação, perdas econômicas e contaminação de lençol freático. O nitrogênio é o nutriente cuja perda é mais provável através de lixiviação, e esta se dá na forma de NO_3^- , por sua fraca aderência às estruturas químicas do solo. Neste contexto, é de grande importância para a agroindústria um resíduo rico em nitrogênio, com este elemento ligado covalentemente (um fertilizante de liberação lenta de nitrogênio), que proporcione uma menor perda de nitrato ao lençol freático e perda de produtividade. Quando aplicados apropriadamente, estes resíduos orgânicos podem fornecer uma alternativa excelente para fertilizantes como meio de aumento da produção agrícola (Harrison e colaboradores, 2003). No entanto, devem ser feitas considerações cuidadosas para que se tenha certeza de que os riscos ambientais serão mínimos e que as perdas por lixiviação e degradação do solo não ocorram realmente (Maia, 1999).

Dentre os efeitos decorrentes da degradação do solo são de particular importância e complexidade aqueles associados à matéria orgânica do solo (MOS), visto que alterações na quantidade e qualidade desta, podem ocorrer em função das práticas de manejo do solo (Dick e colaboradores, 2002). A matéria orgânica (MO), embora um componente em menor quantidade na vasta maioria dos solos, é a principal responsável pela estrutura e sustentabilidade do ecossistema. Apesar disto, após mais de dois séculos de estudos, a dinâmica, reações e características químicas da matéria orgânica do solo permaneçam pouco elucidadas. A matéria orgânica do solo resulta da acumulação dos produtos da decomposição de plantas, e da decomposição parcial de resíduos de plantas e de animais. Em consequência a MOS pode ser dividida em material húmico e não húmico. O material húmico, ou húmus, é definido como material orgânico que foi transformado em formas relativamente estáveis por microorganismos do solo (Bohn e colaboradores, 1985). É esclarecedor dizer que há quem designe o húmus como a própria matéria orgânica total do solo. Para se estudar o húmus este deve ser separado do material não húmico. Para isso, este pode ser fracionado quimicamente em substâncias húmicas (SH). As substâncias húmicas são onipresentes e encontram-se onde quer que haja matéria orgânica em decomposição. Neste contexto, a elucidação das estruturas das SH vem a contribuir no entendimento da dinâmica destas com o meio ambiente, o que é bastante discutido hoje em dia em termos de seqüestro de carbono e aquecimento global (Hayes e Malcom, 2001).

Um grande número de técnicas químicas e, em especial, as espectroscópicas [ressonância paramagnética eletrônica (EPR), ressonância magnética nuclear (NMR) em estado sólido, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa (DRIFT), espectroscopia no ultravioleta visível (UV-VIS) de amostra sólida, dentre outras], têm sido usadas na identificação, composição e estrutura de resíduos agroindustriais, bem como das substâncias húmicas (Budziak e colaboradores, 2004).

A caracterização destas amostras pode gerar um grande número de variáveis. Neste sentido, o modelo estatístico de métodos multivariados considera

a correlação entre estas variáveis permitindo a extração de uma quantidade maior de informações além de separar as informações importantes das redundantes.

Neste contexto, tanto o estudo de metodologias que minimizem os impactos causados pela má disposição de resíduos industriais, bem como o estudo das substâncias húmicas presentes nos solos, são de fundamental importância em se tratando de preservação de meio ambiente bem como do entendimento da atividade destas substâncias nos ambientes.

Procurando abranger esta temática, cada item (introdução, materiais e métodos, etc) abordado neste trabalho, refere-se a dois assuntos, que são: a) nitratação de lodo biológico (resíduo da indústria de celulose); que apresenta um grande potencial de poluição (lembrar o desastre ecológico ocorrido com o lodo da indústria Cataguazes de Minas Gerais); a idéia é que, após os processos de oxidação/redução, este resíduo poderá ser utilizado como um fertilizante de liberação lenta de nitrogênio, voltando este a produção agroflorestal e evitando assim o despejo do mesmo nas lagoas de decantação que, conforme citado, são de alto risco ambiental; b) extração, isolamento e caracterização de substâncias húmicas extraídas de solos sob diferentes manejos, com ênfase nas metodologias de extração e isolamento de substâncias húmicas utilizadas e dos resultados obtidos. Aos dois assuntos aplicam-se análises multivariadas nos dados obtidos para auxiliar a interpretação dos mesmos.

1.1 INTRODUÇÃO - INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de madeira serrada. Dados de 1996 indicam uma produção total de 22,5 milhões de toneladas (folhosas mais coníferas). O consumo desta produção coloca o país em quinto lugar no mundo, mas longe ainda da Rússia (90 milhões) e dos EUA (110 milhões) (Souza, 1997).

A expectativa é de crescimento acelerado para os próximos anos segundo a FAO ("Food and Agricultural Organization"). A produção de madeira de reflorestamento - *Pinus taeda*, *Eucalyptus grandis* - vem crescendo de forma acentuada. A perspectiva de produção de madeira serrada de *Pinus* para 2001 foi de cerca de 8 milhões de metros cúbicos. A produção da madeira de eucalipto também tendeu ao crescimento, particularmente entre as empresas de celulose e papel. Os últimos dados do IBGE, que são do ano de 2001, divulgaram que a produção de lenha (m³) e madeira em tora (m³) foram de aproximadamente 70 milhões (extração vegetal) e 100 milhões (silvicultura). Com esta produção de 22,5 milhões de toneladas de madeira serrada e eficiência em torno de 50%, a indústria brasileira gera 11,25 milhões de toneladas de resíduos (Souza, 1997).

Diversos resíduos são gerados no processo de produção de celulose e papel. A disposição destes materiais gera problemas, devido aos grandes volumes acumulados e conseqüentes danos ambientais decorrentes do seu destino inadequado. À partir da década de 90, várias empresas iniciaram um processo para gestão de seus resíduos com um enfoque que busca basicamente qualidade ambiental e maior economia. A reciclagem destes resíduos, portanto, é uma necessidade e surge como alternativa de renda para as empresas geradoras. O lodo biológico (LB) das estações de tratamento de efluentes é uma fonte rica em matéria orgânica e, de modo geral, podem ser reutilizados na agricultura (Maia, e colaboradores, 1998).

1.1.1 Caracterização do Resíduo

1.1.1.1 Lodo Biológico

O lodo biológico (LB) é um dos resíduos gerados nas estações de tratamento de efluentes (ETE) das empresas de papel e celulose.

O uso de resíduos orgânicos florestais como componentes de substratos para produção de mudas é prática comum em diversas empresas e vem sendo estudado em diferentes países (Maia e colaboradores, 1998).

Estudos foram realizados na EMBRAPA Florestas objetivando avaliar o uso de casca de *Pinus* e do lodo biológico (Tabela 1) como componentes de substratos para a produção de mudas de *Pinus taeda*. Para se conhecer as proporções mais adequadas dessas misturas, deve-se proceder a estudos mais detalhados que levem em consideração as características químicas e físicas do substrato. Além disso, a viabilidade econômica sempre deve ser dimensionada considerando os custos de transporte e aplicação, os resultados para diferentes espécies e os ganhos ambientais obtidos pela reciclagem deste resíduo (Maia, 1999; Moro, 1994).

1.1.1.2 Características do Lodo Biológico

A Tabela 1 apresenta resultados de análises de lodo biológico de fábrica de papel e celulose, em base seca.

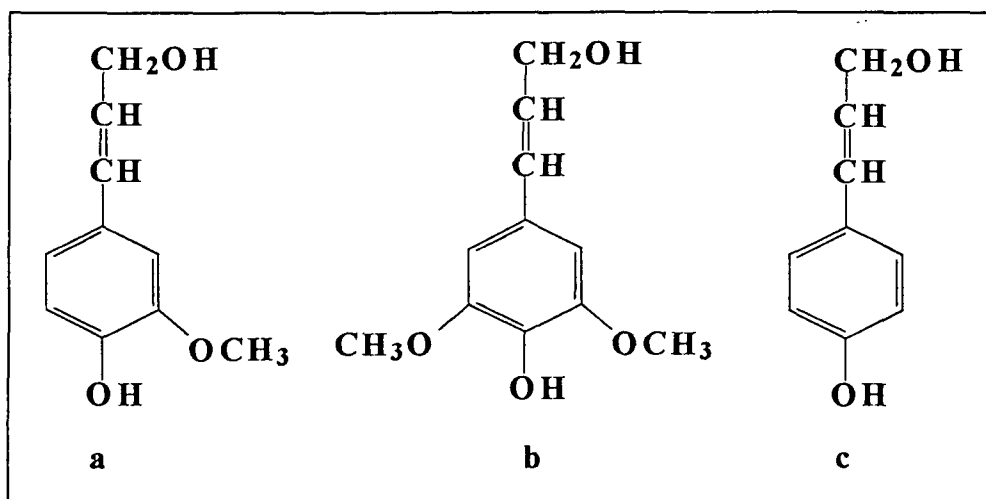
Tabela 1: Análise de fertilidade do substrato lodo biológico

pH	K ⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺ +Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	MO	P	Na ⁺
CaCl ₂	g/kg	cmol/dm ³	cmol/dm ³	cmol/dm ³	cmol/dm ³	g/kg	mg/kg	mg/kg
5,76	1,66	9,70	11,70	0	3,68	105,19	567	690

Maia, 1999.

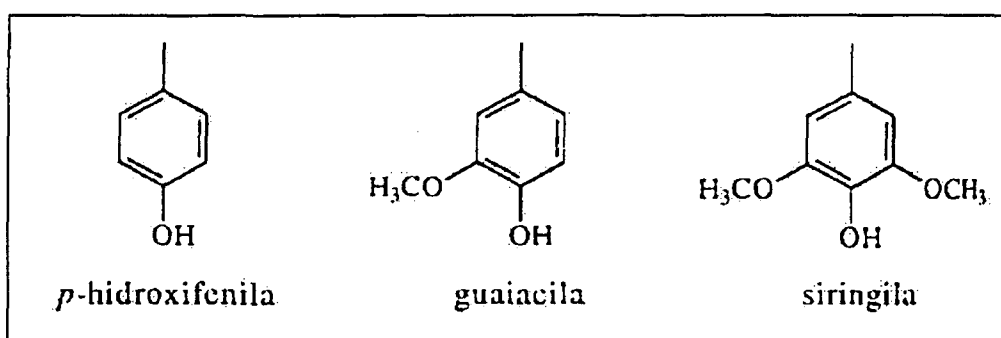
A matéria orgânica (MO) do lodo biológico é constituída em grande parte por estruturas de lignina. A lignina é um dos três constituintes principais da madeira. É um polímero natural proveniente da condensação desidrogenada de três álcoois precursores: *trans*-coniferílico (a), *trans*-sinapílico (b) e *para*-cumarílico (c) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura dos álcoois precursores de ligninas



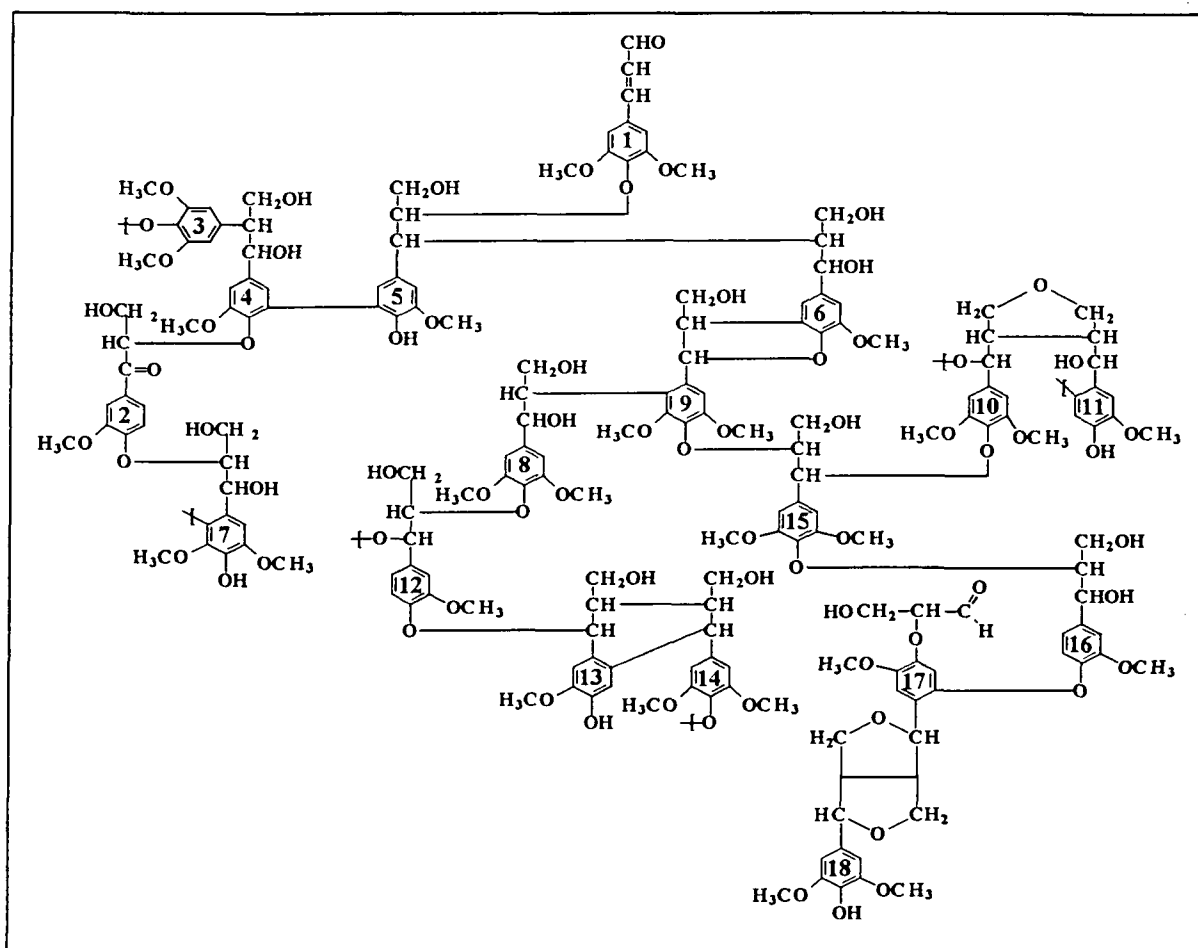
Apesar das evidências experimentais, alguns cientistas contestavam a natureza aromática da lignina no seu estado nativo. Somente em 1954, Lange (citado por Santos, 2001) mostrou que os espectros no ultravioleta (UV) de seções finas da madeira eram característicos de compostos aromáticos e, de acordo com os estudos químicos desenvolvidos na década de 40, as principais unidades aromáticas presentes na estrutura da lignina foram classificadas como *para*-hidroxifenila, guaiacila e siringila (Figura 2).

Figura 2. Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina



Em 1974, Nimz propôs um esquema para a lignina de faia (*Fagus silvatica*), que é um tipo de madeira dura. Em 1992, Moraes propôs um fragmento representativo da lignina do *Eucalyptus grandis*, o qual está mostrado na Figura 3.

Figura 3: Fragmento da estrutura proposta para a lignina do *Eucalyptus grandis*, segundo Moraes (1992)



Apesar de alguns parâmetros de composição da lignina, como por exemplo, fenóis derivados de lignina, já serem amplamente estudados (Dittmar e colaboradores, 2001a, 2001b; Standley e colaboradores, 1998) muitos pontos relativos a sua estrutura ainda permanecem em dúvida, mesmo considerando-se a grande contribuição trazida pela aplicação de técnicas de análise instrumental (Sjöström, 1993; Freudenberg, 1968).

1.1.2 Importância da Caracterização do Lodo Biológico

A influência da matéria orgânica (MO) sobre as propriedades químicas e físicas do solo está relacionada com seu alto poder complexante de íons metálicos (complexos em solução e de superfície), o qual por sua vez, é governado principalmente pelo tipo e abundância de grupos funcionais oxigenados e nitrogenados (Sposito, 1984; Stevenson, 1994). Adicionalmente, estudos recentes têm mostrado que a interação da MO com compostos orgânicos antropogênicos pode ocorrer por meio do efeito hidrofóbico e de interações do tipo Van der Waals, cujas intensidades são influenciadas pela proporção entre a fração aromática e a fração alifática da MO (Stumm, 1992; Murphy e colaboradores, 1994; Almendros, 1995). Conseqüentemente, na utilização de lodos orgânicos para fins agrícolas, é necessária a identificação prévia da composição química de seus produtos de decomposição, a fim de comprovar a ocorrência do processo de humificação e estimar a qualidade do produto final.

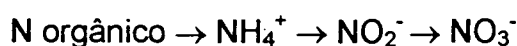
Dick, e colaboradores, 1998 estudaram a caracterização de produtos de decomposição de lodos orgânicos oriundos da fabricação de celulose, em diferentes tempos e meios de digestão (Maia e colaboradores, 2000 e Budziak e colaboradores, 2004) onde foram extraídas frações da MO com solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. As frações foram caracterizadas por análise elementar (C, H, N), teor de cinzas, razão E₄/E₆, espectroscopia UV/Vis, infravermelho (IV) e RMN de ¹³C concluindo os autores que, os lodos orgânicos acondicionados em biodigestores geraram MO plausível de ser reutilizada em solos.

1.1.3 O Nutriente Nitrogênio e os Fertilizantes de Liberação Lenta

O nitrogênio é o nutriente exigido em maior quantidade pelas culturas. Por ser um elemento afetado por uma dinâmica complexa e que não deixa efeitos residuais diretos das adubações, o manejo adequado da adubação nitrogenada é dos mais difíceis. No solo, o nitrogênio existe predominantemente em formas orgânicas, em uma enorme variedade de compostos ou íons, que refletem a diversidade de compostos orgânicos existentes em plantas e em microorganismos

do solo. O húmus ou matéria orgânica do solo apresenta, de uma maneira genérica, proteínas, aminoácidos livres, açúcares ligados a aminoácidos e outros compostos nitrogenados não identificados (Raij, 1991).

Com o passar dos anos de cultivo, o declínio do teor total de nitrogênio no solo tem importantes consequências práticas. Em cada ano, o suprimento é variável, dependendo de condições climáticas do momento, que podem afetar de forma inconstante a mineralização da matéria orgânica. As formas disponíveis mais importantes de nitrogênio inorgânico são os íons amônio e nitrato. O nitrogênio orgânico precisa, então, sofrer transformações antes de se tornar disponível, na seguinte sequência:



Embora o íon amônio possa ser fornecido ao solo sob a forma de sais, muitas vezes a forma mais absorvida pelas plantas é o nitrato, devido às transformações de um em outro; mas, o íon nitrato é muito móvel no solo, estando sujeito à lixiviação em climas úmidos, podendo mesmo ascender no solo, em períodos secos de grande evaporação de água na superfície do solo. Neste contexto, é extremamente importante para a agricultura produzir um fertilizante de liberação lenta de nitrogênio (FLLN) evitando-se assim, perdas deste elemento, de rentabilidade de produção e uma possível contaminação do lençol freático. (RAIJ, 1991). Owens e colaboradores, 1999, compararam a lixiviação de N na forma de nitrato com duas formulações diferentes de fertilizante nitrogenados em adubações de forrageiras. Concluíram que a perda de nitrato foi menor quando se utilizou FLLN (metileno uréia) do que da utilização de nitrato de amônia (fertilizante inorgânico convencional). Ramirez e colaboradores, 1997, testaram lignina modificada como FLLN no cultivo de sorgo. Esta lignina modificada foi uma fonte satisfatória de nitrogênio mostrando menor quantidade de nitrato na água percolada do que na água do solo fertilizado com sulfato de amônio (fertilizante inorgânico convencional).

Utilizando-se formulações específicas de fertilizantes para liberar N em sincronia com o crescimento da planta, é possível prover quantidades suficientes de N em uma única aplicação satisfazendo assim os requerimentos da planta e mantendo também baixas concentrações de N mineral no solo durante toda a estação de crescimento. Com este conceito, muitas perdas gasosas poderão ser diminuídas devido ao substrato limitado.

Existem muitas formas de FLLN, dentre elas podem-se citar:

a) Fertilizantes encapsulados: fertilizantes solúveis em água que são revestidos por uma barreira difusora; como por exemplo, os revestidos com enxofre ou com resinas;

b) Mudança no tamanho físico dos fertilizantes granulados: uso de grânulos bem maiores de uréia, usualmente chamados de supergrânulos de uréia; a combinação do maior tamanho da partícula com uma aplicação em profundidade do fertilizante diminui as perdas por lixiviação;

c) Modificações químicas: geralmente complexos de compostos de N orgânico, por exemplo, condensados de aldeídos com uréia que são menos solúveis em água que uréia (Peoples e colaboradores, 1995).

Kraus e Warren (2000) comparando fertilizantes nitrogenados inorgânicos e fertilizantes nitrogenados na forma de irrigação com um composto proveniente do resíduo da produção de aves (cama de peru) na produção de mudas de pinheiros sugeriram que a liberação de N e P do composto foi mais lenta e que essa fonte, rica em nutrientes, pode substituir o uso de calcário dolomítico e alguns micronutrientes na produção destas mudas.

García-Gómez e colaboradores (2003) trabalharam com compostagem de resíduos de azeite de oliva, com adição de uréia e sem adição de uréia. Observaram que a degradação de lignina e celulose durante a compostagem foi de 60% para o composto sem uréia e de 39% para o composto com uréia. Observaram que no composto, com adição de uréia, apesar da menor produção, apresentou um produto final com menor C/N. A menor degradação deveu-se a liberação de amônia durante a hidrólise da uréia, o que acabou inibindo a atividade de fungos responsáveis pela degradação de compostos lignocelulósicos.

1.1.4 O Processo Nitração/Oxidação

O mecanismo comumente aceito para a nitração de compostos aromáticos é o de substituição eletrofílica, enquanto que para compostos alifáticos o mecanismo mais comum é o de nitração via radicais livres (Olah e colaboradores, 1989; March, 1992 citados por Cardoso, 2001)¹. A nitração do anel aromático desativa o anel, dificultando novas nitrações, em uma reação que é irreversível e cujos produtos são facilmente separados e analisados (Cardoso e colaboradores, 2001). O método mais comum para a nitração aromática é através da reação entre um substrato aromático e o ácido nítrico em vários meios: ácido, orgânico ou aquoso (Taylor, 1990; Olah e colaboradores, 1989; Olah e colaboradores, 1982; March, 1992 citados por Cardoso e colaboradores, 2001)². Em qualquer destes meios parece indiscutível a participação do íon nitrônio como principal agente nitrante. O primeiro pesquisador a propor o cátion NO_2^+ (íon nitrônio) como agente nitrante foi Euler³ (citado por Cardoso e colaboradores, 2001) em 1903, muito embora a existência do íon NO_2^+ tenha sido demonstrada de forma conclusiva apenas em 1946.

Como resultado de uma série de trabalhos iniciados em 1946, Ingold e Hughes⁴ (citados por Cardoso e colaboradores, 2001) propuseram um mecanismo que é constituído de quatro etapas elementares, conforme mostra o Esquema 1. As etapas (1) e (2) estão associadas à formação do eletrófilo, NO_2^+ , o qual, na terceira etapa, reage com o substrato aromático formando o intermediário de Wheland, complexo sigma ou íon arênio (ArHNO_2^+). Este sofre rápida desprotonação na última etapa levando ao produto nitrado.

¹OLAH, G. A.; MALHOTA, R.; NARANG, S.C. **Nitration Methods and Mechanisms**. VCH Publishers. New York, 1989.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms and Structure**. Wiley-Interscience. New York, 1992.

²TAYLOR, R. **Electrophilic Aromatic Substitution**, John Wiley. Chichester, 1990.

OLAH, G. A.; NARANG, S. C.; OLAH, J. A.; LAMMERTSMA, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79, 4487, 1982.

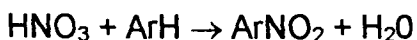
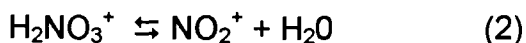
³EULER, E. *Lieb. Ann. Chem.* 330, 280, 1903.

⁴HUGHES, E. D.; INGOLD, C. K.; REED, R. I. *Nature*, 158, 448, 1946.

INGOLD, C. K.; **Structure and Mechanisms in Organic Chemistry**. Cornell University Press, New York, 1969.

INGOLD, C. K.; HUGHES, E. D. e colaboradores; *J. Chem. Soc.*, 2400, 1950.

Esquema 1: Etapas do mecanismo de Ingold-Hughes para a nitração eletrofílica aromática:



A formação do íon arênio (etapa 3 do Esquema 1) explica os efeitos de orientação posicional e de seletividade de substratos, induzidos por grupos substituintes no anel aromático. Segundo o mecanismo de Ingold-Hughes, substituintes doadores de elétrons aumentam a densidade eletrônica do anel aromático e, portanto sua reatividade, observando-se o contrário para os substituintes atratores de elétrons, o que levaria a uma seletividade em relação ao substrato aromático. Esta seletividade resulta da diferença na velocidade de reação de diferentes espécies aromáticas, em função de estas serem mais ou menos ativadas. Grupos doadores de elétrons aumentam a densidade eletrônica nas posições orto e para, portanto, direcionam o eletrófilo (NO_2^+) para estas posições. Por sua vez, grupos atratores de elétrons diminuem a densidade eletrônica nas posições orto e para, sem afetar a posição meta, resultando, portanto, em produtos substituídos nesta posição.

Do ponto de vista cinético observa-se que a velocidade da reação de nitração aromática possui cinética que é dependente das condições reacionais e da natureza do substrato aromático (Lowry, e colaboradores, citados por Cardoso e colaboradores, 2001)⁵. Em um ácido inorgânico a fração de ácido nítrico convertida em íon nitrônio é uma função da acidez do meio. Na presença de excesso de ácido, o ácido nítrico é totalmente convertido em NO_2^+ . Desta forma, as etapas 1 e 2 do mecanismo de Ingold-Hughes são rápidas e reversíveis,

⁵ LOWRY, T. H.; RICHARDSON, K. S. **Mechanism and Theory in Organic Chemistry**. Harper and Row. New York. 1987.

ficando a etapa lenta a cargo das etapas 3 ou 4. A etapa 4 não pode ser a etapa determinante da velocidade da reação, visto que, neste caso, dever-se-ia esperar um efeito isotópico primário na nitração, o que não é observado. Estes resultados indicam que a etapa lenta da reação é a formação do íon arênio (Esquema 1, etapa 3) (Melander, 1960 citado por Cardoso e colaboradores, 2001)⁶.

Em um meio ácido a etapa lenta determinante da velocidade da reação é o ataque do íon NO_2^+ ao substrato aromático, enquanto que em um meio orgânico a etapa determinante da velocidade da reação é a formação do íon NO_2^+ , com velocidade de reação independente da concentração da espécie aromática (CARDOSO e colaboradores, 2001).

1.1.4.1 Processo Nitração/Oxidação de Compostos Orgânicos

A oxidação de turfas, de AH de solos ou AH de lodos, com ácido nítrico (HNO_3) em diferentes concentrações, ou com misturas sulfonítricas, tem sido usada como um método conveniente para se obter produtos de oxidação/nitração parciais, que são utilizadas como fertilizantes orgânicos mais eficientes que a matéria orgânica (MO) natural (Moliner e colaboradores, 1983a, 1983b; Mangrich e Vugman, 1990; Mangrich e Vugman, 1988). Esta reação de oxidação/nitração, produz também, modificações nas várias funções nitrogenadas que existiam previamente no material húmico do solo, ou sedimento orgânico (Moliner e colaboradores, 1983b; Mangrich e Vugman, 1990). São, principalmente, essas três ações sobre o material húmico original, nitração, oxidação e modificação das funções nitrogenadas, que dão características especiais às interações destes compostos nitrogenados com íons metálicos, um fator importante de fertilização. A maior eficiência destes compostos orgânicos nitrogenados, como fertilizantes orgânicos é explicado como sendo consequência de possuírem a relação nitrogênio/carbono mais elevada e maior teor de grupos carboxílicos, queladores de íons metálicos nutrientes de plantas (Mangrich e Vugman, 1990; Mercê e colaboradores, 1998; Mercê e colaboradores, 1996).

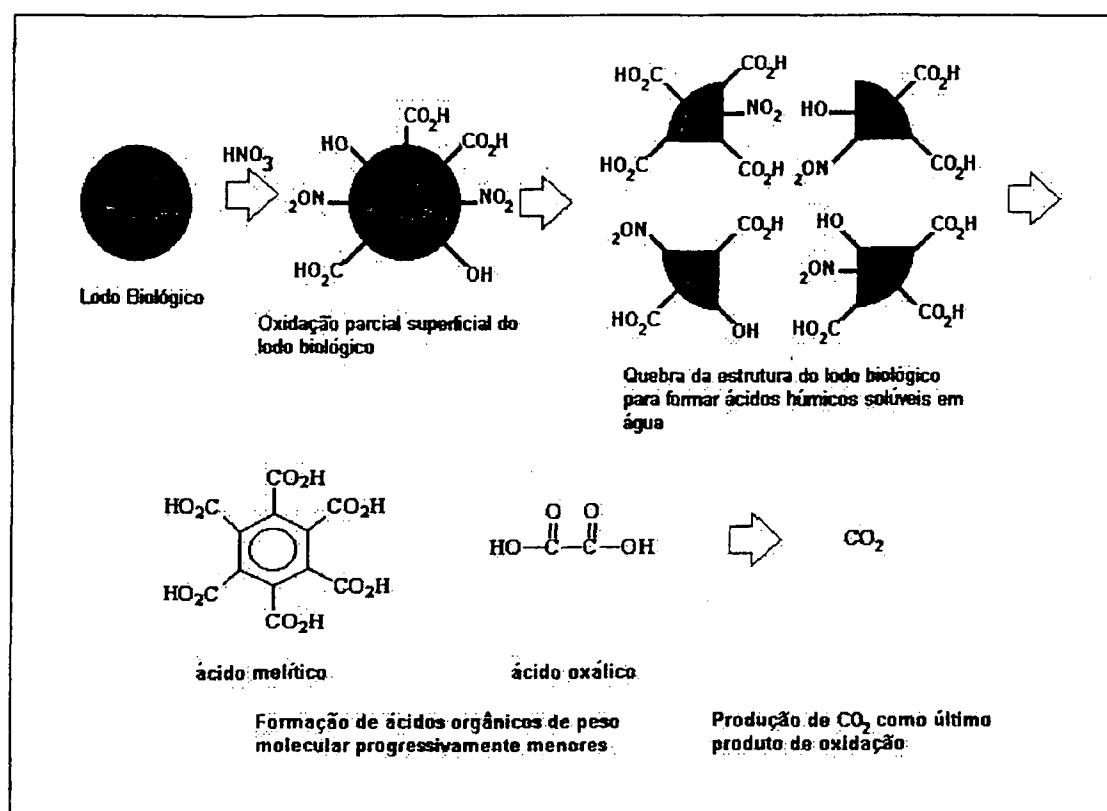
⁶ MELANDER, L. *Isotope Effects on Reactions Rates*. Roland Press. New York. 1960.

Dick e colaboradores, 2002, mostraram que a nitratação de carvões e de ácidos húmicos (AH) extraídos destes carvões elevou o teor de N reduzindo a relação C/N.

Alvarez e colaboradores, 2003, mostraram a eficiência da nitratação em carvões utilizando ácido nítrico à baixa temperatura (50 °C). O HNO₃ causou efetiva nitratação do carvão, sendo este nitrogênio incorporado especialmente como nitrogênio aromático.

A seguir é mostrado modelo do processo de nitratação/oxidação com formação de compostos orgânicos nitrogenados a partir de resíduo de empresa de celulose (lodo biológico).

Figura 4: Seqüência da oxidação de lodo biológico com formação de ácidos orgânicos progressivamente menores (adaptado de Manahan e colaboradores - 1978)



1.1.5 O Processo Redução de Compostos Orgânicos Nitrados

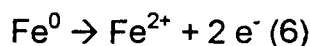
O ferro é o quarto mais abundante elemento na crosta terrestre com aproximadamente 5,1% de participação em massa. Dependendo das condições ambientais, o ferro pode formar compostos estáveis em ambos os estados divalente e trivalente. A variação redox entre Fe (II) e Fe (III) cumpre uma importante função nos processos redox em solos anóxicos, sedimentos e SH (Straub e colaboradores, 2001).

Com a finalidade de criar sítios com ligantes nitrogenados para quelação de ácidos mais moles (Cu^{2+} , p.e.), há necessidade de se reduzir os grupos nitro a aminas. Segundo, Agrawal e Tratnyek, 1996, o produto primário da redução de grupos nitro pelo Fe^0 é a formação de aminas aromáticas.

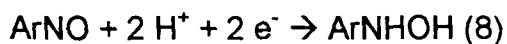
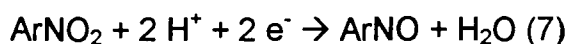
A completa redução do ArNO_2 a anilina (ArNH_2) pelo Fe^0 envolve seis elétrons e pode ser descrita como:



A equação 5 representa a soma de várias meias-reações envolvendo dois elétrons: a oxidação do Fe^0



e a sequencial redução do ArNO_2 a nitrosobenzeno (ArNO), fenil hidroxilamina (ArNHOH) e anilina.



$\text{ArNHOH} + 3 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{ArNH}_3^+ + \text{H}_2\text{O} \quad (9)$ (Scherer e colaboradores, 2001).

Outra forma de se realizar a redução de compostos orgânicos nitrados é utilizando SnCl_2 em meio ácido seguindo a seguinte reação:



1.2 INTRODUÇÃO - EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO

A superfície da Terra é alterada constantemente através de processos naturais e antropogênicos, em alguns casos com enormes efeitos deletérios. O solo surgiu como resultado destes processos de alterações naturais, chamados de intemperismo. Este se processa por muitas alterações físicas, químicas e biológicas, formando um complexo de minerais com a participação da MOS. O horizonte superficial é o mais rico em MO, formada pela deterioração de plantas, principalmente, e de animais. Além do seqüestro de carbono, a MOS tem papel crucial na qualidade dos solos; melhorando sua fertilidade, ciclagem de nutrientes, retenção e fornecimento de nutrientes às plantas e na criação e na manutenção da estrutura do solo (Allison, 1973). Por estas razões, se justifica a curiosidade científica com relação à compreensão da natureza da MOS.

Hayes e Swift (1978) consideraram que a fração orgânica do solo é composta de organismos vivos e de seus resíduos remanescentes decompostos parcialmente e/ou completamente transformados. Os microrganismos do solo decompõem a MOS transformando-a em material amorfo marrom escuro, ou totalmente escuro, que é dividido em material húmico, ou húmus, e material não húmico, conforme citado anteriormente. Assim, neste trabalho, o húmus é definido como o material orgânico que foi transformado em formas relativamente estáveis, por microorganismos do solo (Bohn e colaboradores, 1985). Por outro lado, a matéria inorgânica do solo (MIS) pode ser dividida em minerais primários, com tamanhos mínimos de partículas de até ~ 20 µm (quartzo, feldspatos, micas, pedras, areias, silte), e secundários, com tamanhos de partículas menores que ~ 20 µm (argilas lamelares, óxidos metálicos) (Lombardi, 2002). Em solos minerais, as frações argila e o húmus estão intimamente associados (Schreiner e colaboradores, 2001). Mais recentemente, a importância da MOS e a qualidade do meio ambiente tem sido considerada em relação ao aquecimento global, ou ao chamado, efeito da estufa. Hoje é aceito que a atividade humana, tanto agrícola como industrial, criou um desequilíbrio entre fontes e dissipadores globais de C,

causando um aumento nos gases atmosféricos. Neste contexto, o manejo do solo é importante em termos do aquecimento global (Lal e colaboradores, 1995). A separação, o fracionamento e a caracterização de húmus de solos minerais, com vistas a se aferir diferenças nas estruturas químicas em função do tipo de manejo, é assunto de contínuo estudo na área de substâncias húmicas (Hayes & Malcom, 2001), é também em nosso grupo (Novotny, 1997, 1999, Caetano, 2002) bem como também, nesta tese.

1.2.1 Classificação da Matéria Orgânica de Solo

O conteúdo de matéria orgânica (MO) de um solo em particular é dependente de um número de fatores, tais como o clima, vegetação, topografia, natureza original, e tempo. Assim, pode-se esperar um grau elevado de variabilidade no índice da matéria orgânica entre solos diferentes como, por exemplo, os 15 cm superiores de solos arenosos, contém tipicamente matéria orgânica de um por cento, e alguns solos mal drenados podem conter dez por cento ou mais de matéria orgânica (Stevenson, 1994). A fração orgânica do solo consiste de organismos vivos e de resíduos de plantas e de animais. A matéria orgânica de solo (MOS) é uma acumulação da decomposição de plantas, e da decomposição parcial de resíduos de plantas e de animais. Em consequência a MOS pode ser dividida em material húmico e não húmico. O húmus é definido como material orgânico que foi transformado em formas relativamente estáveis por microorganismos do solo (Bohn e colaboradores, 1985). Para se estudar o húmus este deve ser separado do material orgânico não húmico. A primeira tentativa de se isolar substâncias húmicas do solo foi feita provavelmente por Achard em 1786, o qual extraiu carvão com álcali sob acidificação e obteve um precipitado escuro, amorfo.

Desde então, tem-se estudado os vários aspectos das substâncias húmicas, incluindo procedimentos de extração, estudos estruturais, formação e interações estruturais.

O procedimento geral de extração envolve o uso de álcali (que pode alterar as substâncias húmicas através da hidrólise e auto-oxidação). Os componentes neste extrato podem ser parcialmente fracionados pela precipitação com ácidos, sais metálicos, ou diferenças de solubilidade em solventes orgânicos.

1.2.2 Definições Básicas de Substâncias Húmicas

As substâncias húmicas (SH) são onipresentes e encontram-se onde quer que haja matéria orgânica em decomposição, ou sendo transportada, como no caso de sedimentos. Daí então, as SH são encontradas em qualquer ambiente onde quer que haja matéria orgânica proveniente de solos, sedimentos ou água (Hayes e Swift, 1990).

As substâncias húmicas são definidas de forma geral porque não são compostos individuais no sentido químico, mais parecendo uma “coleção” de macromoléculas orgânicas, proximamente relacionadas (Stainsak, 2003). Quimicamente, as SH são amplamente divididas em três frações principais - ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), e humina (HU). Estes são definidos como segue:

Ácidos húmicos (AH): nos termos de Aiken e colaboradores (1985) ácidos húmicos consistem na fração de substâncias húmicas que precipitam em soluções aquosas quando o pH é reduzido a 2 ou menos de 2.

Ácidos fúlvicos (AF): fração das substâncias húmicas que são solúveis em água sob todas as condições de pH.

Humina: esta é a fração das substâncias húmicas que não é solúvel em água em nenhum valor de pH.

Assim, não é possível separar substâncias húmicas em compostos puros. Estas têm sido parcialmente fracionadas baseadas em características químicas e de tamanho molecular. Mesmo em se tratando da obtenção de frações homogêneas (por exemplo, uma escala estreita de peso molecular) ainda assim estas serão muito heterogêneas (não se pode esperar que mesmo duas moléculas de escala molecular semelhante sejam idênticas).

1.2.3 Formação das Substâncias Húmicas

Cientistas de solo e água pesquisam estruturas químicas de substâncias húmicas há muito tempo. Há um considerável sucesso em atribuir funcionalidades, entretanto, ainda não há nenhum conceito estrutural confiável. Isto pode ser atribuído às misturas complexas nas associações das moléculas que compõem as SH. Assim ainda não foi possível estabelecer uma relação entre os aspectos estruturais químicos das SH e métodos de manejo do solo.

Vários caminhos têm sido descritos para a formação das substâncias húmicas durante a decomposição dos resíduos de plantas e animais remanescentes no solo. Estes podem então ser refinados para formar dois conceitos básicos: a) a proposta degradativa e b) o conceito de síntese.

A proposta degradativa considera que as moléculas naturais tais como as ligninas (macromoléculas parafínicas contendo Nitrogênio), substâncias parafínicas proveniente de plantas cuticulares, proteínas e carboidratos modificados, tornam-se parte dos resíduos da humina. Quando estes resíduos suportam populações microbianas, os grupos funcionais polares podem ser introduzidos nas estruturas, e as transformações subseqüentes podem levar a formação de ácidos húmicos, e então a formação de ácidos fúlvicos. A lignina é composta de unidades similares como verificado na Figura 1. Sugere-se que estas unidades básicas combinam-se via radicais livres fenóxi mesoméricos para produzir a lignina.

Waksman (1932) propôs um caminho degradativo com a lignina como fonte principal. Na teoria de Waksman, a lignina é considerada como sendo somente parcialmente degradada pelos microorganismos do solo, e estes resíduos então incorporados ao húmus no solo. A ação dos microorganismos na lignina modifica sua estrutura, resultando na perda de grupos metoxil e na oxidação das cadeias laterais alifáticas (Flaig, 1988). Estes produtos iniciais podem ser considerados como contribuidores à fração humina do solo (na definição clássica); uma posterior oxidação destes produtos poderia resultar na formação de ácidos húmicos, e subseqüentemente de ácidos fúlvicos. Em solos mal drenados, os fungos

requeridos no processo de degradação da lignina são ausentes, e faltam também as circunstâncias aeróbicas requeridas para a despolimerização microbiana da lignina.

A proposta sintética é chamada também de “o caminho da policondensação”, e esta tem a sua origem no trabalho do químico francês, Maillard (1912 e 1917). Considera-se que as substâncias húmicas são formadas das reações entre pequenos componentes químicos orgânicos no solo. É baseada na reação de “Escurecimento de Maillard”. Os açúcares simples reduzidos, tais como glucose, condensada com aminoácidos, tais como a glicina, formam substâncias macromoleculares de cor marrom. Estas mostram algumas semelhanças às propriedades das substâncias húmicas, mas exibem também diferenças. Ambas são melhor discutidas por Hayes e Swift (1990).

Outros pesquisadores também têm enfatizado a síntese das substâncias húmicas. Felbeck (1971) listou as seguintes quatro hipóteses para a formação das substâncias húmicas:

a) hipótese da alteração da planta:

Partes de plantas resistentes à degradação microbiana degradam superficialmente para dar forma às substâncias húmicas. Os AH e a humina são formados inicialmente e subsequenteemente degradados em AF, e eventualmente em CO_2 e H_2O . O material original destas plantas influencia a natureza do húmicos formados.

b) hipótese química da polimerização:

Estas plantas são degradadas pelos microorganismos que usam estes produtos da degradação como fonte de energia e de carbono. Os microorganismos sintetizam subsequenteemente fenóis, aminoácidos, etc., que são então exportados deste ambiente, sofrendo oxidação e polimerização, formando as substâncias húmicas. O material original desta planta não tem nenhum efeito nos produtos finais.

c) hipótese da autólise da célula:

As substâncias húmicas são os produtos da autólise das plantas e das células microbianas as quais já estão inoperantes. Seus açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos condensam-se e polimerizam-se.

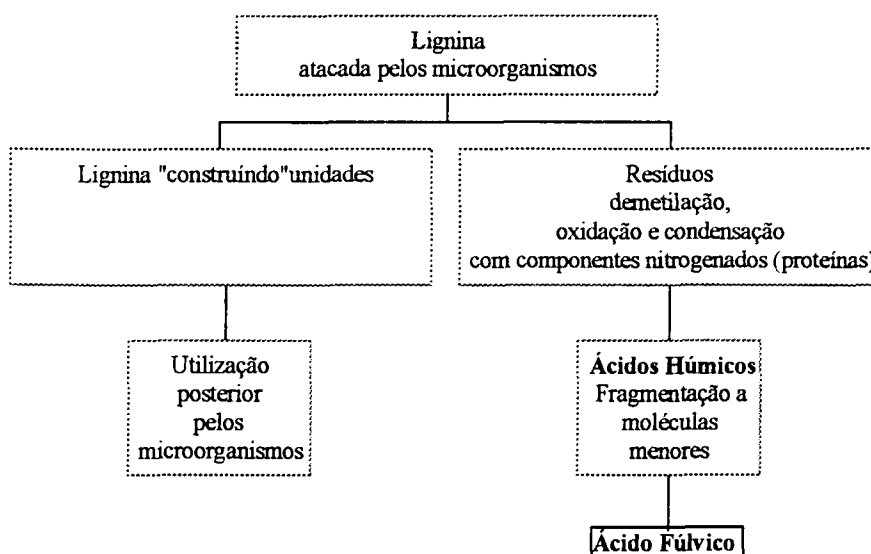
d) hipótese da síntese microbiana:

Microorganismos usam tecidos de plantas como fonte de carbono e energia para sintetizar materiais húmicos de alto peso molecular intercelulares. Quando estes microorganismos morrem estes são liberados no ambiente, onde são atacados pela degradação extracelular formando AH, AF, humina, e eventualmente CO_2 e H_2O .

De acordo com Schnitzer (1978), é provável que todos os quatro processos ocorram simultaneamente, embora sob determinadas circunstâncias um ou outro poderia dominar. Entretanto, é provável que materiais de peso molecular mais elevado serão formados primeiramente e estes serão então degradados subsequente em materiais de menor peso molecular (Schnitzer, 1978).

Uma representação esquemática da teoria da lignina é mostrada na figura 5.

Figura 5: Representação esquemática da teoria da lignina na formação do húmus (Stevenson, 1994)



1.2.4 Estrutura e Propriedades Químicas das Substâncias Húmicas

As substâncias húmicas são misturas brutas que ainda não foram separadas em frações puras ou razoavelmente puras. Em consequência, os dados obtidos de degradações químicas, espectroscopias, e afins devem ser interpretados com cuidado. Assim, em uma amostra de substâncias húmicas, por exemplo, somente algumas das moléculas podem apresentar fluorescência; somente uma proporção pequena contribuirá a um sinal de ressonância de spin eletrônico, isto é, somente algumas moléculas reagirão a um dado experimento (Stevenson, 1994). Usando os resultados de vários procedimentos químicos e físico-químicos de substâncias húmicas, é possível identificar grupos funcionais, ligações, alguns componentes estruturais, etc. Entretanto, não é possível atribuir estes a uma molécula ou a posição particular dentro de uma molécula.

Um grande número de técnicas, tais como as espectroscopias [ressonância magnética nuclear (RMN), em estado líquido ou sólido, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de massa, espectroscopia no ultravioleta (UV), dentre outras], têm sido usadas na identificação de componentes das SH.

Problemas são encontrados na aplicação de métodos degradativos no estudo de substâncias húmicas. Quando o material de partida é “aberto” usando estes métodos, os produtos finais podem não carregar nenhuma semelhança ao material original. Uma dificuldade adicional existe também porque os produtos desta degradação são geralmente identificados via seus análogos metilados (ácidos como ésteres, fenólicos como éteres metilados). Isto significa que não é possível se diferenciar entre os ésteres originalmente presentes nas SH daqueles formados com propósitos de detecção.

As espectroscopias são ferramentas muito importantes porque indicam conteúdo de funcionalidades e o caráter alifático/aromático. Usando RMN de ^{13}C quantitativo é possível medir o conteúdo de aromáticos e alifáticos das SH com elevado grau de exatidão (Novotny e colaboradores, 2001).

De acordo com Stevenson (1985), uma molécula do “tipo” ácido húmico consiste de micelas de natureza polimérica, de estrutura básica na qual um anel aromático do tipo di ou tri hidróxi-fenol é ligado por -O -, -CH₂ -, -NH -, -N =, -S -, e outros grupos, contendo tanto grupos OH livres como ligações duplas de quinonas.

Outros componentes estruturais têm sido identificados, como açúcares e aminoácidos, a partir de hidrólises. Baseado em dados espectroscópicos, o núcleo de materiais húmicos parece conter alto conteúdo de aromáticos/fenólicos, bem como ácidos carboxílicos e grupos funcionais hidroxil.

Maiores detalhes sobre estudos estruturais em substâncias húmicas são encontrados em Hayes e Malcom, 2001, Hayes e colaboradores, (1989), Stevenson (1985), Stevenson (1994), Schnitzer (1978).

1.2.5 Distribuição das Substâncias Húmicas

A tabela 2 fornece uma estimativa para as reservas de carbono orgânico de diferentes fontes. É geralmente aceito que 50% da matéria orgânica do solo seja composta de substâncias húmicas; entretanto isto variará, dependendo do ambiente (Hayes e colaboradores, 2001, 1989).

Malcolm, 1985, sugere que a concentração média de substâncias húmicas dissolvidas em águas visualmente sem cor nos EUA é de 2,2 mg C L⁻¹, ou 4,4 mg C L⁻¹, expressada como SH e que o valor médio de carbono orgânico dissolvido (COD) para os mesmos dados é de 1,5 a 10 mg C L⁻¹. A relação de ácidos fúlvicos aquáticos aos ácidos húmicos aquáticos é de aproximadamente 9:1.

Tabela 2: Estimativa das reservas orgânicas de carbono em diferentes reservatórios (Hayes e colaboradores, 2001, 1989)

Local	Conteúdo de Carbono ($\times 10^{-15}$ g)
Atmosfera	692
Solo	
Biota	592-827
Matéria Orgânica de solo	2000-3000
Ácidos húmicos de solo	1000-1500
Sedimentos (total)	$> 1 \times 10^7$
Combustíveis fossilizados	> 5000
Águas	
Oceanos	
Carbono orgânico dissolvido (COD)	1000
Carbono orgânico particulado (COP)	30
Plâncton	3
Água doce	
Lagos e rios	
COD	0,738
COP	0.396

Baseado na tecnologia da resina XAD, o carbono orgânico dissolvido pode ser dividido em seis frações: ácidos, bases e neutros hidrofóbicos; ácidos, bases e neutros hidrofílicos (Leenheer, 1981). Em consequência, os processos de adsorção e desorção podem ser controlados pelo pH do meio aquoso. A baixo pH, o equilíbrio de um ácido orgânico favorece a formação de cargas protonadas não carregadas as quais são sorvidas pela resina. Quando o pH é elevado, o ácido ioniza-se e é desorvido. Solutos orgânicos hidrofóbicos neutros não são eluídos em meios aquoso, mas o são em solventes orgânicos tais como metanol, etanol, ou acetonitrila (Malcolm e colaboradores, 1977). Substâncias húmicas são os componentes principais da fração ácida hidrofóbica. Estes compostos variam em concentração de 2 mg L^{-1} no lençol freático até mais de 30 mg L^{-1} em águas de superfície (Thurman e Malcolm, 1981). A resina XAD-8 é usada para isolar frações hidrofóbicas e a resina XAD-4 para isolar as frações hidrofílica.

1.2.6 Extração, Isolamento e Fracionamento de Substâncias Húmicas de Solo usando Extratores Aquosos a diferentes pH e Resinas XAD

1.2.6.1 Extração de Substâncias Húmicas

A fim de se estudar a estrutura de qualquer macromolécula, é necessário isolá-la de seu ambiente natural e purificá-la. Entretanto, isto não ocorre facilmente quando se trata de substâncias húmicas (SH). Como já mencionado SH são polieletrólitos extremamente complexos, associados a colóides inorgânicos e outros componentes do solo. De acordo com Clapp e colaboradores (1993) os procedimentos usados para isolar SH devem cobrir a composição das macromoléculas, os meios pelas quais estão associadas umas com as outras e com os colóides inorgânicos do solo. Porque não há nenhuma evidência do controle genético ou biológico da síntese das substâncias húmicas, seria inviável tentar isolar as macromoléculas húmicas que são homogêneas com relação à composição e à estrutura. Os procedimentos de extração representaram sempre a etapa mais crítica no estudo de substâncias húmicas de solo.

Malcolm e MacCarthy (1986) descreveram a extração e o isolamento de AH e AF de solos e sedimentos como um processo muito trabalhoso e de grande consumo de tempo. A maioria dos pesquisadores na ânsia de conduzir experimentos relacionados à natureza diversa e à reatividade das SH, decidem que o processo inicial de extração, isolamento e de purificação de SH de águas, solos, ou sedimentos que devem ser devidamente investigados, não são necessários. Alguns pesquisadores podem considerar o processo da extração como um aborrecimento, bem como causar desnecessário atraso de semanas ou até meses antes de se começar a real experimentação. Na realidade, estas etapas constituem os pré-requisitos essenciais aos estudos significativos em SH, e compreendem uma parte indispensável do projeto experimental. Pelas razões acima citadas muitos pesquisadores têm usado "ácidos húmicos comercialmente disponíveis" em seus estudos, e estes podem resultar em dados enganadores. Maiores detalhes com relação ao isolamento de SH de solo são encontrados em

Flaig e colaboradores 1975; Hayes e colaboradores 1975a; Hayes e Swift 1978; Schnitzer 1978; Stevenson 1994; Hayes 1985; Hayes e Swift 1991; Clapp e colaboradores, 1993.

Dubach e Mehta (1963) descreveram o método ideal de extração os quais apresentam os seguintes objetivos:

- 1) O método deve conduzir ao isolamento do material inalterado;
- 2) As SH extraídas devem ser livres de contaminantes inorgânicos, tais como argilas e cátions polivalentes;
- 3) A extração é completa, desse modo assegurando frações representativas provenientes do material original;
- 4) O método deve ser universalmente aplicável a todos os solos.

Hayes (1985) fez uma profunda revisão de literatura com relação a extração de substâncias húmicas de solo. Whitehead e Tinsley (1964) propuseram quatro critérios de eficiência na utilização de solventes para a extração de substâncias húmicas, os quais devem ter:

- 1) Uma polaridade elevada e altas constantes dielétricas ou permissividade auxiliando a dispersão das moléculas carregadas;
- 2) Um tamanho molecular pequeno para penetrar na estrutura húmica;
- 3) Habilidade de quebrar as ligações de hidrogênio existentes, e de fornecer grupos alternativos à formação de pontes de hidrogênio entre o solvente e o material húmico;
- 4) Habilidade de imobilizar cátions inorgânicos.

Estes objetivos ainda não foram alcançados. Por exemplo, há o problema de remoção de impurezas orgânicas adsorvidas (hidratos de carbono, compostos proteináceos, etc.) da "verdadeira" SH.

Vários métodos têm sido propostos para o isolamento e o fracionamento da matéria orgânica do solo (MOS) (Flaig e colaboradores 1975; Hayes e Swift, 1978; Schnitzer, 1978) e os princípios envolvidos nestas metodologias de fracionamento de SH são descritos em Swift (1985). O fracionamento se refere à subdivisão da SH baseado em alguma das propriedades da sua composição molecular. De acordo com Swift (1985) ainda há alguns pesquisadores que propõem o

fracionamento de SH com o objetivo de serem recompensados com compostos identificados razoavelmente puros. Porque SH são uma mistura, não é sensato esperar isolar um composto(s) puro. Na sua maioria, o fracionamento pode somente diminuir a heterogeneidade do sistema tanto quanto possível. Na maioria dos casos o fracionamento é realizado após a extração para facilitar o entendimento das estruturas que compõem as SH realizando-se posteriores análises. É usado assim como uma etapa preliminar às medidas espectrais.

Tradicionalmente, o fracionamento das SH é baseado nas diferenças de solubilidade em soluções aquosas a diferentes valores de pH, em álcool e sob diferentes concentrações do eletrólito ("salting out"). SH tem sido fracionadas utilizando-se outros métodos, incluindo, variação do pH das soluções extratoras pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) e hidróxido de sódio (NaOH) (Lindqvist, 1968) e a adição de várias quantidades de íons metálicos (Pb^{+2} , Ba^{+2} , Cu^{+2}) (Sowden e Deuci, 1961).

Hayes e Swift (1978) sugeriram que a extração seqüencial fornece um refinamento adicional aos procedimentos, obtendo-se assim frações menos heterogêneas da matéria orgânica de solo; e que os solventes não-polares, seguidos por solventes apróticos dipolares e então por soluções alcalinas, fornecem uma boa série de solventes para o isolamento e fracionamento simultâneos da matéria orgânica de solo (Scheffer e Ulrich, 1960, Felbeck, 1971, Hayes e colaboradores 1975a, e Sciacovelli e colaboradores 1977, Hayes e Malcolm, 2001).

Idealmente, os métodos usados para a extração das substâncias húmicas do solo não devem alterar quimicamente a matéria húmica e o produto final deve estar livre de contaminantes orgânicos e inorgânicos (Hayes, 1985; Stevenson, 1994). O tratamento com HCl, utilizado como pré-tratamento na metodologia de extração adotada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas ("IHSS") para isolar ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) padrões, pode resultar na formação de artefatos (Malcolm, 1976; Thunann & Malcolm, 1981; Grøn e Raben-Lange, 1992) afetando assim os rendimentos totais dos produtos húmicos (Hayes e colaboradores, 1975a; Garcia e colaboradores, 1993). O tratamento de HCl/HF é

usado geralmente para remover os contaminantes inorgânicos das SH, e é também usado para retirar as “cinzas” dos padrões húmicos de solo no procedimento sugerido pela IHSS. Entretanto, este tratamento também leva a uma perda significativa da SH extraída (Stevenson, 1994). Um procedimento alternativo e suave, envolvendo filtração através de filtro de membrana de tamanho de poro de 0,2 μm (ou menor), remove argilas e contaminantes particulados dos isolados húmicos. Neste trabalho, decidiu-se conseqüentemente, se evitar o pré-tratamento ácido.

Os resultados de Alexandrova (1960) indicam que as quantidades de SH extraídas com soluções de sal neutras não diminuem quando o tratamento ácido é evitado.

Bremner e Lees (1949) mostraram que até 30% da matéria orgânica nos solos estudados poderia ser isolada como SH utilizando-se pirofosfato de sódio 0,1M a pH 7. Hayes e colaboradores (1975a) mostrou como o tratamento prévio de acidificação pode decrescer as quantidades extraídas. Pirofosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em pH ambiente é um extrator mais eficiente (do que uma solução neutra) em função das condições alcalinas geradas (Choudhri e Stevenson, 1957). Alguns pesquisadores (Kononova, 1966; Schnitzer e colaboradores 1981) usaram a mistura das soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pirofosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ as quais combinam as propriedades de elevado pH com as propriedades complexantes metálicas do pirofosfato (Hayes, 1985).

A razão de se usar uma série de solventes a diferentes pH, isto é, crescentes pH é que, quanto mais se eleva o pH do solvente extrator, mais grupos funcionais se tornam ionizados e diferentes conformações moleculares são verificadas pela repulsão entre os grupos adjacentes carregados negativamente e a SH solvatada. Desta forma, Hayes e colaboradores 1985, sugerem a seguinte seqüência de solventes:

- 1) Pirofosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 7,6):

Este apresenta propriedades moderadas de solvatação. O pirofosfato forma preferencialmente complexos com cátions divalentes e polivalentes, responsáveis pela formação de “pontes” inter e intramoleculares entre as moléculas húmicas.

Este efeito de “ponte” inibe a solvatação da SH. Quando o pirofosfato complexa os cátions polivalentes, as SH ficam livres para solvatar.

2) Pirofosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 10,6):

Neste sistema, como no anterior, o pirofosfato complexa cátions polivalentes. A elevado pH, o aumento da solubilidade proporciona a ionização de grupamentos ácidos fracos (comparado com o solvente a pH 7,6). Para minimizar a oxidação a altos valores de pH, é necessário realizar a extração sob atmosfera de gás N_2 .

3) Pirofosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 12,6):

Este sistema leva a recuperação de SH contendo funcionalidades, as quais não são ionizáveis a baixos valores de pH, como alguns fenóis e enóis. O procedimento deve ser realizado em atmosfera inerte para evitar a formação de artefatos a este elevado valor de pH.

1.2.6.1.1 Filtro de Tamanho de Poro Controlado

Colóides de argila, por exemplo, encontram-se na escala de tamanho de 0,001 a 1,0 μm aproximadamente. Este problema pode ser superado com o uso de filtros de tamanho de poro controlado.

Quando membranas de 0,45 μm encontram-se parcialmente saturadas (poros parcialmente obstruídos), o tamanho eficaz do poro é reduzido < a 0,1 μm . Assim sendo, ao se filtrar a solução extraída é importante filtrá-la duas vezes. A primeira filtração teria a função de saturar os poros do filtro e a segunda filtração, já com o filtro “parcialmente obstruído”, será então mais eficiente. Há um certo número de filtros disponíveis, com diferentes tamanhos e tipos, utilizados na filtração de substâncias húmicas, e as vantagens e as desvantagens dos vários tipos de filtros são esboçadas na tabela 3.

Tabela 3: Vantagens e desvantagens de filtros de diferentes matrizes usados na filtração de materiais extraídos para posterior isolamento de substâncias húmicas de solo e aquáticas (Aiken, 1985)

Tipo de Matriz	Vantagens	Desvantagens
Membrana de Prata	Tamanho de poro uniforme e propriedades bactericidas.	Características de baixo fluxo; cara; baixa sorção de certos componentes orgânicos, como as mercaptanas.
Fibra de vidro	Características de alto fluxo; econômica.	Partículas maiores que o tamanho de poro nominal podem passar através do filtro.
Membrana Orgânica, Acetato de Celulose/Nitrato de Celulose	Tamanho de poro uniforme; econômica.	Agentes de "molhamento" contaminam o filtrado; Sorção de orgânicos pela matriz.

Surfactantes orgânicos são incorporados em filtros de membrana orgânicos (por exemplo, acetato de celulose e nitrato de celulose) para aumentar a capacidade de "molhamento" dos mesmos. Estes surfactantes lixiviam e contaminam os materiais filtrados (Hwang e colaboradores, 1979), a menos que sejam removidos lavando-os com grandes quantidades de água destilada. Filtros de membrana de acetato de celulose Sartorius 0,2 µm foram empregados neste estudo; estes não contêm agentes de molhamento, e têm um caráter de carga menor do que os filtros de nitrato.

1.2.6.2 Isolamento e Fracionamento de Substâncias Húmicas utilizando Resinas XAD

Os métodos usados para isolar substâncias húmicas incluem: precipitação (Jeffrey e Hood, 1958; Klöcking e Mücke, 1969; Sridharan e Lee, 1972; Leenheer, 1984); ultrafiltração (Milanovich e colaboradores, 1975); extração usando solvente

(Eberle e Schweer, 1974); resinas trocadoras aniônicas (Packman, 1964); congelar a seco (liofilização) (Malcolm, 1968 e Milanovich e colaboradores, 1975); concentração congelada (Baker, 1970); e osmose reversa (Deinzer e colaboradores, 1975). Entretanto, estes métodos tiveram seu sucesso limitado porque estes permitem somente o isolamento e/ou a recuperação parcial das substâncias húmicas. Além disso, as amostras obtidas continham contaminantes orgânicos e inorgânicos não-húmicos (Malcolm, 1991).

Um importante passo no isolamento de substâncias húmicas foi o uso de resinas Amberlite XAD. Muito dos trabalhos de pesquisa básica no uso destas resinas foram realizados nos Laboratórios de Exame Geológico dos Estados Unidos em Denver, Colorado, EUA. Diversas resinas XAD foram avaliadas, e vários procedimentos foram desenvolvidos no isolamento de constituintes orgânicos, incluindo substâncias húmicas de solo e água (Malcolm, 1991).

O processo da resina XAD envolve a sorção seletiva das SH e de sua recuperação subsequente das resinas. Os solventes orgânicos não são usados na preparação da amostra, e as técnicas envolvidas são simples, rápidas para grandes volumes de água (no caso de substâncias húmicas provenientes de água) e quantitativas (Thunna e Malcolm, 1981).

A tecnologia da resina pode ser usada para a separação de sacarídeos ligados não covalentemente a peptídeos, e de outras impurezas orgânicas. Hatlsler (1986), Afisler e Hayes (1996), e Anderson e colaboradores (1987) usaram a XAD-8 com esta finalidade.

Esta resina é usada no isolamento de ácidos fúlvicos de solos (AF) no procedimento da IHSS.

As resinas XAD são polímeros não iônicos, macroporosos de grandes áreas superficiais (tabela 4). XAD-1, XAD-2 e XAD-4 são copolímeros aromáticos de estireno divinil benzeno; XAD-7 e XAD-8 são polímeros alifáticos do ácido metil acrílico (tabela 3). XAD-1 e XAD-2 têm sido usadas para isolar substâncias húmicas de águas do mar (Stuermer e Harvey, 1977), e XAD-2 e XAD-8 tem sido usadas para isolar estas substâncias húmicas de águas de superfície, de lençol freático e substâncias húmicas de solo (Weber e Wilson, 1975; Thunna e

Malcolm, 1981). Entretanto, tem-se verificado que eluir substâncias húmicas das resinas de estireno divinil benzeno (XAD-1, -2, -4) é mais difícil do que das resinas hidrofílicas de éster acrílico (tabela 3). Isto pode ser relacionado às propriedades de relativa polaridade e às propriedades aromáticas/não aromáticas das resinas. Solutos orgânicos são retidos aos adsorventes alifáticos por processos físicos de adsorção de baixa energia ($1 - 5 \text{ kcal M}^{-1}$), tais como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (Simpson, 1972). No caso das resinas de estireno divinil benzeno, a adsorção poderia envolver interações hidrofóbicas e possível interações π - π com os componentes aromáticos da matriz. Além disso, a cinética de sorção do ácido fúlvico nas resinas aromáticas é lenta, e a difusão nos poros menores é a etapa controladora desta velocidade (Aiken, 1985).

Entretanto, porque a XAD-7 e XAD-8 são mais hidrofílicas, elas “molham” mais prontamente, tem cinéticas de sorção mais rápidas e permitem que o equilíbrio seja alcançado mais rapidamente. Apresentam também alta capacidade de sorção, e são mais eficientes na fase de eluição inversa. Entretanto, a XAD-7 proporciona sérios problemas de “sangramento da resina” em NaOH e assim a XAD-8 deve ser usada em preferência à XAD-7 no isolamento de substâncias húmicas (Aiken e colaboradores 1985).

Powell e colaboradores (1992) e Town e Powell (1993) sugerem que AH recuperados usando a tecnologia da resina XAD-8 são diferentes daqueles isolados na maneira convencional quando os valores de pH de extratos alcalinos do solo são ajustados a 1. Seus estudos indicam que as moléculas húmicas grandes (peso molecular $> 30\,000$) não são sorvidas pelas resinas XAD. Yonebayai e Hattori (1990) sorveram AH na resina XAD-8 a pH 3 e eluíram a pH 7 e 11, em uma solução de 50% de etanol e não encontraram nenhum problema.

Ping e colaboradores (1994) mostraram o uso das resinas XAD-8 e XAD-4 em seqüência (Malcolm e MacCarthy, 1992) para o isolamento das frações húmicas de solos provenientes do Alasca, indicando que os AH foram recuperados satisfatoriamente pelo procedimento usado. Maiores informações sobre a aplicação das resinas XAD no isolamento de SH do solo é verificado em Clapp e Hayes, 1996. Estes usaram uma técnica de extração seqüencial e

exaustiva no isolamento de frações húmicas de um solo Mollisol. Suas considerações levam a combinar o procedimento exaustivo e seqüencial da extração com as técnicas da resina. Esta combinação pode fornecer o fracionamento baseado em diferenças nas funcionalidades ácidas, bem como em diferenças de densidade de carga, e de polaridade. A resina XAD-8 foi usada neste estudo para isolar as frações hidrofóbicas. A figura 6 mostra a possível estrutura da matriz da resina XAD-8 usada no processo de isolamento.

FIGURA 6: Componentes estruturais da resina XAD-8 (éster acrílico) usadas no isolamento de SH (Aiken, 1985)

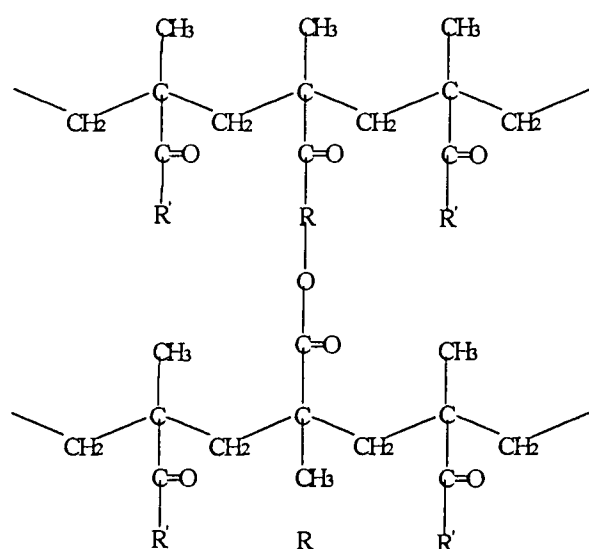


Tabela 4: Propriedades das resinas XAD (Aiken, 1985)

Número da Resina XAD	Área de superfície $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Tamanho de Poro (Å)	Ligações Cruzadas	Densidade	Polaridade	Eficiência de Eluição
Polímero Estireno divinil benzeno						
1	100	200	Baixa	1.06	Não	70
2	330	90	Moderada	1.08	Não	75
4	750	50	Alta	1.09	Não	70
Polímero Éster Acrílico						
7	450	80	Moderada	1.25	Leve	98
8	250	250	Baixa	1.26	Leve	98

As resinas devem ser meticulosamente limpas (lavadas) antes do seu uso. Pequenos conteúdos de contaminantes podem se incorporar permanentemente na matriz da resina por ligações irreversíveis. É essencial remover tais substâncias, usando-se extração soxhlet com solventes orgânicos, para eliminar a contaminação cruzada nas amostras. Maiores detalhes dos processos de limpeza destas resinas são descritos por Hayes (1993).

1.3 INTRODUÇÃO - PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE DADOS

Um dos problemas mais comuns ao se realizar um experimento, é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. No planejamento de qualquer experimento, o primeiro passo a ser tomado é a definição de quais são os fatores e as respostas de interesse. Os fatores, em geral, são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar. Podem ser qualitativos como o tipo de catalisador, ou quantitativos, como a temperatura. As respostas são as variáveis de saída do sistema, sobre as quais há o interesse e que serão ou não afetadas por modificações provocadas nos fatores. Também podem ser qualitativas ou quantitativas. Dependendo do problema, se pode ter várias respostas de interesse, que talvez precisem ser consideradas simultaneamente (Barros Neto e colaboradores, 2001).

O planejamento dos experimentos, isto é, a especificação detalhada de todas as operações experimentais que devem ser realizadas, vai depender do objetivo particular que ele quiser atingir.

Planejamentos fatoriais são muito úteis em investigações preliminares, quando se quer saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta, e não se está preocupado ainda em descrever muito rigorosamente esta resposta (Box e colaboradores, citados por Barros Neto e colaboradores, 2001)⁷.

Planejamentos fatoriais têm sido usados para verificar a influência da erosão (simulação da remoção da superfície do solo) na perda de produção de

⁷ BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experiments: an Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York. Wiley. 1978.

trigo (*Triticum aestivum* L. cv. 'Roblin') e para determinar a extensão da quantidade perdida de nitrogênio e potássio em dois solos artificialmente erodidos (Izaurre e colaboradores, 1998). Estes planejamentos têm sido usados também como estratégias alternativas para facilitar as medidas de amostragem em perfis de solo (Ritter e colaboradores, 2004), na otimização da flotação de carvões (Pradyumna e colaboradores, 2004) e na otimização das propriedades físico-químicas de silicatos de Ferro (III) (Bogacki e colaboradores, 2004).

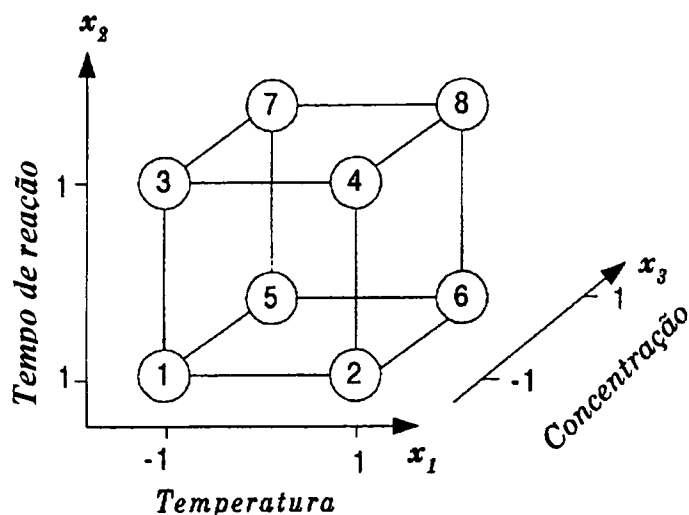
Para executar um planejamento fatorial, se inicia especificando os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores dos fatores (ou as classes, nos casos qualitativos) que serão usados para fazer os experimentos. Para fazer um planejamento fatorial completo, se deve realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Cada um desses experimentos, em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definidos, é um ensaio experimental (Barros Neto e colaboradores, 2001).

Estudos de otimização, empregando análises fatoriais e metodologia de superfícies de resposta, têm sido usadas na investigação dos efeitos de diferentes fontes de nitrogênio (Gorret e colaboradores, 2004).

1.3.1 Planejamento Fatorial 2^3

Quando temos três fatores de interesse no estudo e desejamos variá-los todos ao mesmo tempo devemos construir um planejamento fatorial 2^3 como pode ser visto na Figura 7 a seguir. No caso da Figura 7 (exemplo de planejamento 2^3) os três fatores de interesse são: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tempo de reação (horas) e concentração (mol L^{-1}).

Figura 7: Interpretação geométrica dos efeitos em um planejamento 2^3



Um exemplo destes ensaios está disposto na Tabela 5 e 6 na chamada ordem padrão. Todas as colunas começam com o nível -1 e depois os sinais vão se alternando. Um a um na primeira coluna — + — + ..., depois dois a dois, — — + + ..., e finalmente quatro sinais negativos e quatro positivos, na terceira coluna. Assim, se pode escrever a matriz de planejamento de qualquer fatorial de dois níveis. Ao se reescrever a matriz de planejamento (Tabela 5), se substitui os elementos pelos sinais algébricos que identificam o nível como superior (+) ou inferior (-), assim os elementos 40, 6 e 1,0 serão substituídos pelo sinal menos e os elementos 60, 12 e 6 serão substituídos pelo sinal mais (Tabela 6).

Fatores	(-)	(+)
1: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	40	60
2: Tempo de reação	6	12
3: Concentração (mol L^{-1})	1,0	6,0

Tabela 5: Resultados do planejamento fatorial 2^3 - Fatores

Ensaio	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de reação (horas)	Concentração (mol L^{-1})
1	40	6	1,0
2	60	6	1,0
3	40	12	1,0
4	60	12	1,0
5	40	6	6,0
6	60	6	6,0
7	40	12	6,0
8	60	12	6,0

Tabela 6: Resultados do planejamento fatorial 2^3 – Nível superior e inferior

Ensaio	1	2	3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

(Barros Neto e colaboradores, 2001)

1.3.2 Planejamento em Estrela

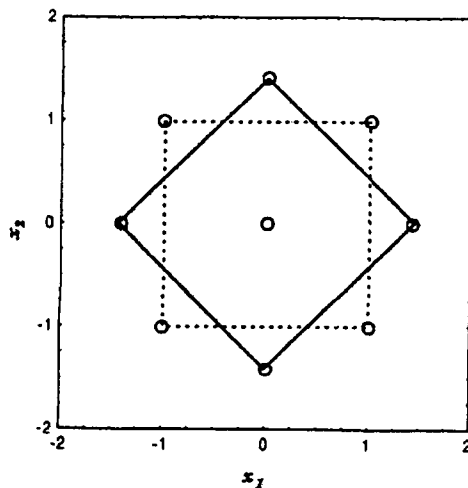
Quando não é mais possível determinar as estimativas em função da existência de mais parâmetros do que níveis, é necessário ampliar o planejamento. A ampliação pode ser feita de várias formas, sendo a mais comum a construção do chamado planejamento em estrela.

Este tipo de planejamento é utilizado para verificar qual é a tendência da resposta verificada em planejamentos preliminares como o fatorial 2^3 .

O planejamento em estrela pode ser explicado como sendo um fatorial 2^2 com ponto médio, girado de 45° em relação à origem de partida, com isto se obtém 4 novos pontos que, assim como os primeiros, estão a uma distância $2^{1/2}$ unidades codificadas do ponto central estando todos eles sobre uma circunferência de raio $2^{1/2}$. Totalizam assim 9 ensaios onde são estudadas duas variáveis em dois níveis diferentes. O resultado é uma distribuição ortogonal, como mostra a Figura 8 a seguir. (Barros Neto e colaboradores, 2001).

O planejamento em estrela permite determinar a tendência da resposta verificada no planejamento fatorial.

Figura 8: Planejamento em estrela para duas variáveis codificadas



1.3.3 Cálculo dos Efeitos e Interações

Para estudar o efeito de qualquer fator (concentração do HNO_3 , temperatura e tempo de reação) sobre uma dada resposta (oxidação/nitração) é necessário variar de nível e observar o resultado que esta variação produz sobre a resposta.

Quando o efeito de uma variável depende do nível de outra variável, pode-se dizer que as duas variáveis interagem e, portanto, pode-se calcular o valor do efeito de interação entre elas. Por definição, a metade da diferença dos outros efeitos, determina o efeito de interação entre dois fatores. (Barros Neto e colaboradores, 2001). Nos planejamentos de dois níveis costuma-se identificar o nível superior e inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente.

O cálculo do efeito principal pode ser calculado pela diferença entre a média das respostas no nível superior ($\bar{\delta}_+$) e a média das respostas no nível inferior ($\bar{\delta}_-$).

$$\text{Efeito principal (EP)} = \bar{\delta}_+ - \bar{\delta}_-$$

O cálculo das interações é feito da mesma forma que o cálculo do efeito principal.

1.3.4 Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta tem duas etapas distintas, a modelagem e o deslocamento, que são repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a repostas obtidas com planejamentos fatoriais ou com planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (Barros Neto e colaboradores, 2001).

Inicia-se a análise admitindo-se que a superfície de resposta na região investigada é uma função linear dos fatores, e que, portanto a resposta pode ser estimada através da equação:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2,$$

onde b_0 , b_1 e b_2 são estimadores dos parâmetros do modelo e x_1 e x_2 representam os fatores codificados.

Se o modelo linear não servir mais, devemos partir para um modelo quadrático, cuja expressão geral é:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2.$$

Este modelo tem seis parâmetros. Como não é possível determinar as estimativas quando há mais parâmetros do que níveis, é preciso ampliar o planejamento. A ampliação pode ser feita de várias maneiras, sendo a mais comum a construção de um planejamento em estrela.

1.4 INTRODUÇÃO - MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

1.4.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica bastante sensível, não destrutiva e diz respeito à detecção de elétrons desemparelhados de uma amostra, em fase líquida ou sólida, e à caracterização de seu ambiente químico (Nakagaki, e colaboradores, 1997).

A espectroscopia de EPR tem sido utilizada no estudo de SH (Plaza e colaboradores, 2003; Bayer e colaboradores, 2002; Senesi, 1990). Além da identificação de radical livre orgânico (RLO), a espectroscopia de EPR pode fornecer outros parâmetros espectroscópicos como quantificação do fator g, largura de linha e saturação de potência do sinal do radical livre que podem dar informações detalhadas sobre as SH (Martin-Neto e colaboradores, 1994). O valor de g pode ser calculado a partir da posição da linha de ressonância no espectro:

$$g = h \nu / \beta e H$$

Haverá transição entre dois estados de spin quando a frequência (ν) da radiação de microondas satisfaz a equação:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g\beta e H_0$$

onde:

h = constante de Planck;

β_e = magneton de Bohr;

H_0 = campo magnético efetivo;

ν = frequência;

g = fator de proporcionalidade;

Em compostos contendo átomos leves, como radicais livres orgânicos (RLO), o valor de g é próximo ao g do elétron livre ($g_e = 2,0023$), na faixa de 2,0020 a 2,0060. Em espécies químicas constituídas por átomos paramagnéticos mais pesados, como os dos íons dos metais de transição, esses acoplamentos são maiores e os valores de g sofrem uma variação maior (Guimarães, 1997).

1.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

A primeira observação do fenômeno de NMR ocorreu em 1945 (Günther, 1995). As primeiras tentativas de uso da espectroscopia de NMR para a caracterização estrutural das SH foram reportadas por Barton e Schnitzer (1963) e Neyroud e Schnitzer (1972). Espectros de ^{13}C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C CPMAS NMR) de solo inteiro têm sido reportados por Wilson e colaboradores (1981) e desde então a NMR no estado sólido tem sido a técnica mais utilizada para estudos estruturais da matéria orgânica ambiental (Pérez e colaboradores, 2004; Kraus e colaboradores, 2004; Marche e colaboradores, 2003; Hu e colaboradores, 2000; Preston e colaboradores, 1996; Wilson e colaboradores, 1990).

1.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Reflectância Difusa (DRIFT)

As análises por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) têm sido usadas nos estudos de macromoléculas orgânicas

complexas como as SH (Schnitzer, 1971; Stevenson, 1982; Inbar e colaboradores, 1989) e para identificar grupos funcionais em SH, como ácidos carboxílicos, aminas, amidas, grupos alifáticos e grupos hidroxilas (Pain, 1990). Desta forma, permite-se obter valiosas informações sobre a natureza e posição dos grupos funcionais nos ácidos húmicos (AH) das mais diversas origens. Tem sido usada também para avaliações dos efeitos dos extratores químicos utilizados e o grau de pureza alcançado através dos processos de purificação. Outras aplicações da técnica espectroscópica estão relacionadas com a investigação de possíveis trocas nas estruturas químicas das SH e na indicação de interações com pesticidas, metais e argilas nos ambientes aquáticos, terrestres e na investigação de solos *in situ* (Chen e colaboradores, 1977; Senesi e colaboradores, 1989; Martin-Neto e colaboradores, 1994; Arocena e colaboradores 1995; Kononova, 1966; Schnitzer e colaboradores, 1978; Bravard e colaboradores, 1991; Martin-Neto e colaboradores, 1991; Pérez e colaboradores, 2004; Wang e colaboradores, 2004).

Espectroscopia de infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier (DRIFT) tem diversas vantagens sobre a técnica tradicional de pastilha de KBr (Fuller e Griffiths, 1978; Baes e Bloom, 1989). É mais rápida (os espectros de uma amostra em pó podem ser obtidos em menos de um minuto) e necessita pouca preparação da amostra (moer é suficiente) sendo superior por mostrar mais fielmente a presença de componentes inorgânicos nos solos (Nguyen e colaboradores, 1991; Rumpel 2001).

A interpretação dos espectros é difícil, devido à influência crescente de componentes inorgânicos do solo com o aumento da profundidade e a sobreposição entre as bandas de absorção individual (Hempfling e colaboradores, 1987). Alguns destes problemas podem ser superados usando a subtração espectral de espectros de infravermelho digitais (Painter e colaboradores, 1983; Skjemstad e colaboradores, 1993), mas infelizmente os picos no infravermelho de solos e MO são frequentemente demasiado complexos para fornecer dados quantitativos visuais simples (Janik e colaboradores, 1995, Rumpel, 2001).

1.4.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-VIS)

Apesar de seus espectros aparentemente simples, a espectroscopia de UV-VIS se constitui em uma técnica útil para a caracterização das mais variadas substâncias e moléculas em misturas complexas como as das SH. A espectroscopia na região do UV-VIS permite a identificação de transições de elétrons entre grupos adjacentes (transições eletrônicas). Por esta razão, a espectroscopia de UV-VIS é também chamada de espectroscopia eletrônica. Como as suas transições eletrônicas ocorrem, muitas vezes, na faixa do visível, os físicos costumam chamá-la também de espectroscopia óptica. Os elétrons de ligações químicas absorvem energia na faixa do ultravioleta – visível (190 – 800 nm), e os grupos que os contém são chamados cromóforos, grupos insaturados covalentes, responsáveis pela absorção eletrônica, como por exemplo, C=C, C=O ou NO₂. Ligados aos cromóforos estão os auxócromos, grupos saturados, ou átomos, que alteram tanto o comprimento de onda como a intensidade da absorção como, por exemplo, OH, NH₂ e Cl (Silvertin e colaboradores, 1979).

A técnica de UV – VIS é utilizada para medidas da chamada razão E_4/E_6 das SH (Chen e colaboradores, 1977), ou seja, a razão das absorbâncias entre 465 nm (E_4) e 665nm (E_6). A razão E_4/E_6 tem sido utilizada como parâmetro para medida do grau de conjugação e/ou condensação dos anéis aromáticos das SH e logo do grau de humificação complementarmente aos dados obtidos por EPR e FTIR (Rivero e colaboradores, 2004; Guimarães, 1997).

Sabidamente os dados obtidos a partir da razão E_4/E_6 são controversos na literatura (CHEN e colaboradores, 1977) e serão utilizados com o devido cuidado e tentativamente correlacionados com outros parâmetros espectroscópicos mais precisos, como nível de semiquinonas por EPR.

A baixa razão E_4/E_6 está diretamente relacionada com o aumento da massa molecular e condensação de grupos aromáticos e inversamente relacionada com a quantidade de grupos alifáticos. Estudos mostraram que este dado independe da concentração de material húmico, mas varia para materiais obtidos de diferentes tipos de solos e sedimentos (Santos e colaboradores, 1999).

A razão E_2/E_4 (razão entre as absorbâncias em 270 e 407 nm) determinada, então, por absorção no ultravioleta, tem sido um método para distinguir a origem da MO do ambiente. A maior razão E_2/E_4 implica maior participação de plantas terrestres com altos níveis de estruturas de ligninas (absorção em 270 nm).

1.4.4 Análise Elementar de C H N S

As características físicas e químicas de SH dependem de muitos fatores, dentre os quais pode-se citar a procedência do material original, condições climáticas (zona tropical, subtropical, moderada ou fria), acidez e o grau de umidade do solo, podendo variar em relação à composição elementar (KONONOVA, 1966; SCHNITZER e colaboradores, 1972). Desta forma, o percentual de carbono estaria na faixa de 45 a 65 g 100 g⁻¹ (%), a de oxigênio entre 30 e 48 g 100g⁻¹, a de nitrogênio entre 2 e 6 g 100 g⁻¹ e hidrogênio abaixo de 5 g 100 g⁻¹ (KONONOVA, 1966). Tem sido verificado que 75 % do nitrogênio encontrado nos AH provém de aminoácidos, glicosamidas e compostos heterocíclicos (BREMNER, 1966).

A relação C/N é um índice clássico da atividade biótica do solo e diminui, em casos de aporte de material orgânico rico em C, ou aumenta, em casos de aporte de material orgânico rico em N com o grau de decomposição da MOS até estabilizar-se em valores próximos de 10 a 12. As razões atômicas O/C e H/C, por sua vez, são características do grau de transformação da MOS: a alta relação O/C indica elevada transformação sob processos oxidativos, e a baixa relação H/C indica maior aromaticidade das SH. Construindo-se um gráfico da razão H/C versus O/C pode-se classificar as SH de acordo ao grau de transformação destas (PAIM e colaboradores, 1990).

1.4.5 Análises Quimiométricas

A caracterização das amostras por análises químicas e espectroscópicas poderá fornecer um grande número de variáveis. Cada amostra analisada

somente por infravermelho, na faixa média do espectro (4000 a 400 cm^{-1}), em resolução de 2 cm^{-1} , p.e., produz 1800 variáveis. Além do volume de trabalho, na análise individual de cada variável (univariada) perde-se as informações da variância total dos dados e de como essas variáveis se correlacionam. O modelo estatístico de métodos multivariados considera a correlação entre essas variáveis permitindo a extração de uma quantidade maior de informações.

A análise de componentes principais (PCA, do inglês "principal component analysis") é um método exploratório que tem como objetivo separar as informações importantes das redundantes pela redução dos dados a partir da combinação linear das variáveis originais gerando um novo conjunto de variáveis pela decomposição dos dados da matriz X (onde as linhas são as amostras e as colunas são as variáveis) em uma soma de matrizes (novas variáveis chamadas de Componentes Principais). Essas novas matrizes, as CP, são produtos de vetores chamados de "scores" e "loadings". A primeira componente (CP1) é definida na direção de máxima variância do conjunto de dados. A CP2 é definida na direção que descreve a máxima variância no espaço da CP1, de forma que cada componente principal (CP1, CP2 CP3, etc.) é responsável pela fração sucessiva de variância dos dados consistindo num sistema de coordenadas ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas. As primeiras CP explicam a maior parte da variância dos dados e podem ser usadas para representá-los (Wold e colaboradores, 1987 e Geladi e colaboradores, 1989).

Na análise exploratória são examinadas as relações entre as amostras, e entre as variáveis, através de gráficos de "scores" e "loadings" respectivamente, os quais permitem também avaliar a influência de cada variável em cada amostra, encontrando similaridades ou diferenças nos dados (Adams, 1995; Stenberg, 1998).

O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) é freqüentemente usado, como modelo de regressão, isto é, para modelar as relações entre dois grupos de medidas (modelar a relação entre as variáveis dependentes - Y e as variáveis independentes - X) (Rumpel 2001), extraindo informações de espectros complexos (como por exemplo, DRIFT e EPR), podendo tratar eficientemente séries de dados

onde há muitas variáveis altamente correlacionadas, espectros contendo sobreposição de picos de absorção e numerosas variáveis de X, bem como para a determinação de uma ou mais propriedades das variáveis Y (Wold e colaboradores, 2001). Vários trabalhos descrevem o algoritmo básico do PLS (Sjöström e colaboradores, 1983 e Matens e colaboradores, 1989) e as propriedades da variável latente (VL) do PLS. O modelo é construído com base nos resultados das projeções não somente da matriz X, mas também da matriz de Y, criando um modelo de variáveis latentes, na matriz de X que podem explicar a variância em uma ou mais variáveis - Y. O método PLS é similar à análise de componentes principais (PCA), mas cada componente sofre rotação para aumentar a explicação da variável dependente(Y). Um modelo é construído para que amplie a explicação da variação dos dados em ambas as matrizes (X ou Y) em vez de usar uma projeção otimizada para a variação de uma única matriz.

Como na PCA, "scores" e "loadings" são usados para avaliar os resultados do modelo. Após a calibração por um método PLS, o modelo resultante é usado para calcular a propriedade desconhecida, Y (neste trabalho, dados de ^{13}C NMR), de um novo grupo de amostras para as quais somente a matriz X (neste trabalho, dados de EPR e DRIFT) existia (Haaland e Thomas, 1988).

Muitos trabalhos procuram aplicar esse tipo de estratégia para avaliar características intrínsecas à fertilidade do solo e comparar as condições de manejo. Estes trabalhos permitem, por exemplo, classificar solos de acordo com sua fertilidade (Nolin e colaboradores, 1989, Euterhues e colaboradores, 2003 e Rumpel, 2001), com o tipo de manejo (Novotny 1997, 1999), comparar nutrientes de plantas e solos (Németh e colaboradores, 1993), determinar os fatores que controlam a mineralização de nitrogênio em solos úmidos (González-Prieto e colaboradores, 1992), a denitrificação em solos cultivados e não cultivados (Horwath e colaboradores, 1998) e a deterioração de solos semi-áridos pelo uso (Quiroga e colaboradores, 1998). E mais, relacionar propriedades físicas com a formação de turfa, visando melhorar a qualidade do solo (McCoy, 1998); e constatar que a solução do solo é a principal responsável pela acidificação de solos na região meio-oeste da Suécia (Lundstrom e colaboradores, 1998). Outra

aplicação interessante foi o estudo dos parâmetros que controlam a atividade de microorganismos benéficos, visando estabelecer um controle biológico (Duffy e colaboradores, 1997). Métodos quimiométricos foram usados também para verificar diferenças nos parâmetros microbiológicos e químicos em experimentos de longa duração usando lodo biológico como corretivo da fertilidade do solo (Johansson e colaboradores, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo específico 1. Preparação de lodo biológico nitrado/reduzido como FLLN

I) Através de metodologia de oxidação/nitração, com HNO_3 , agregar valor fertilizante ao resíduo lodo biológico de fábrica de celulose;

II) Reduzir os grupos NO_2 do lodo nitrado a amina, com a finalidade de aumentar a variedade de grupos ligantes no futuro FLLN;

III) Caracterizar o lodo biológico, o lodo nitrado, o lodo nitrado e reduzido, por espectroscopia de EPR, por FTIR, por UV-VIS, e por análise elementar (C, H, N).

IV) Analisar os dados obtidos por métodos quimiométricos;

2.2 Objetivo específico 2. Extração, isolamento e fracionamento de SH de solo sob diferentes manejos

I) Extrair, isolar e caracterizar, por análises químicas e espectroscópicas, as substâncias húmicas de solo sob diferentes manejos (campo nativo, plantio direto e floresta), utilizando metodologia de extração exaustiva (três extrações a cada pH) e sequencial com solventes aquosos (pirofosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a diferentes pH (7,6, 10,6 e 12,6);

II) Fracionar e caracterizar, por análises químicas e espectroscópicas, estas substâncias húmicas em ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) a partir desta técnica de extração sequencial;

III) Verificar a aplicabilidade da resina XAD-8 no isolamento destas substâncias húmicas de solo e comparar as frações extraídas, AH (isolados usando a tecnologia da resina XAD-8 e isolados sem o uso da XAD-8) e AF a diferentes pH via métodos espectroscópicos e métodos multivariados (PCA e PLS);

IV) Analisar os dados obtidos por métodos quimiométricos (PCA e PLS);

V) Aplicar o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) como método de regressão e avaliar as correlações entre as técnicas espectroscópicas EPR e DRIFT e ^{13}C NMR, nas amostras de AH e AF, de modo a prever os resultados de ^{13}C NMR por EPR e/ou DRIFT.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS – INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO

O resíduo lodo biológico foi coletado na Fábrica Iguaçu Celulose Ltda. em Pirai do Sul, Paraná.

3.1.1 Nitração/Oxidação

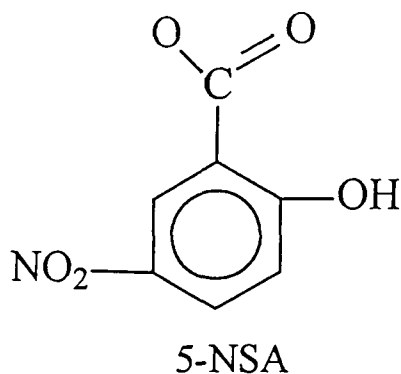
Inicialmente o lodo biológico foi seco ao ar, e após foi seco a 105 °C em estufa, após foi reduzido a pó em moinho de faca.

Uma massa de 10 g de lodo pulverizado foi colocada em um balão de três bocas de 1000 mL, foi adicionada água bidestilada até formar uma massa pastosa. O balão foi transferido para um banho de óleo, sobre uma placa agitadora/aquecedora. Após, foi adicionado ácido nítrico concentrado (HNO₃) (1 e 6 mol L⁻¹). Depois da adição realizada, o balão foi deixado em refluxo em condensador de Allin por um período de 6 e 12 horas, a uma temperatura constante de 40, 50 e 60 °C conforme os ensaios experimentais citados em Tabela 7.

Terminada a etapa de oxidação do lodo, a fase sólida foi separada da fase líquida por filtração em funil de Gooch. A fração sólida foi lavada com aproximadamente 500 mL de água bidestilada até pH neutro e submetida a secagem em estufa a 60 °C (Mangrich e Vugman, 1990). A fração líquida foi guardada em geladeira para análises posteriores.

Utilizou-se o ácido 5-nitrosalicílico como modelo de molécula por apresentar um grupo NO₂, para se efetuar um estudo de comparação entre as amostras em estudo. Embora este modelo seja uma molécula simples, esta permite uma melhor interpretação dos sítios de complexação nas estruturas das substâncias nitro-húmicas (Mercê e colaboradores, 1996). A estrutura do 5-NSA é exibida na Figura 9.

Figura 9: Estrutura do composto modelo ácido 5-nitrosalicílico (5-NSA)



Após a nitração/oxidação foram realizadas análises de EPR e FTIR na fração sólida para a confirmação deste processo.

3.1.2 Redução

Após a etapa de nitração/oxidação, realizou-se a redução do produto sólido (Ensaio 01 = 1 mol L⁻¹ HNO₃, 6 horas, 40 °C) utilizando-se cloreto estanoso (SnCl₂) como um teste inicial para se acompanhar o processo de redução. Em balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 300 mg da amostra nitrada (fase sólida), 50 mL de H₂O destilada e 1 mL de HCl concentrado. Manteve-se esse meio reacional por aproximadamente 15 minutos sob agitação e deaeração, refluxo em condensador de Allin e sob N₂. Após, adicionou-se aproximadamente 500 mg de SnCl₂ e manteve-se este meio reacional por 12 horas. Para retirar-se novamente o O₂ do ambiente reacional deaerou-se este meio por aproximadamente 15 minutos. A seguir, foi colocado no final do condensador de Allin um balão de borracha contendo N₂. Após as 12 horas, a amostra foi lavada e centrifugada quatro vezes até chegar a pH 7,0. A amostra foi então seca em estufa a 60 °C, analisada por EPR, FTIR e Uv-Vis.

Nas mesmas condições acima citadas foram realizados outros ensaios substituindo-se o redutor, substituindo o meio ácido, modificando o pH do meio e variando a temperatura do meio. Estes ensaios constaram de:

- (a) Fe^0 em meio de HCl (1 mL) com temperatura de 60 °C;
- (b) Fe^0 em meio de HCl (2 mL) com temperatura de 60 °C;
- (c) Fe^0 em meio de HCl (2 mL) com temperatura de 80 °C;
- (d) Fe^0 em meio de H_2SO_4 (0,5 mL) com temperatura de 80 °C;
- (e) Palha de aço em meio de HCl (2 mL) com temperatura de 80 °C;
- (f) FeSO_4 em meio de HCl (2 mL) com temperatura de 80 °C.

3.1.3 Planejamento e Otimização dos Dados

3.1.3.1 Planejamento Fatorial 2^3

O planejamento 2^3 foi utilizado para estudar a influência dos três fatores (concentração de HNO_3 , tempo de reação e temperatura de reação) na nitratação/oxidação do lodo biológico. Os fatores estudados, em dois níveis, inferior (-) e superior (+) são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial 2^3

Fatores	(+)	(-)
Concentração de HNO_3	6 mol L ⁻¹	1 mol L ⁻¹
Tempo	12	6
Temperatura	60 °C	40 °C
Resposta: Nitratação/Oxidação do resíduo		

O planejamento completo onde os experimentos foram realizados em todas as combinações possíveis dos níveis e fatores, resultando em 8 ensaios são apresentados na Tabela 8. O ensaio N1 é o lodo biológico sem nenhum tratamento e para se obter um ponto médio das nitrações realizou-se um ensaio com valores intermediários aos utilizados neste planejamento (ensaio N10) utilizando-se 3 mol L⁻¹, 9 horas e 50 °C. (Barros Neto e colaboradores, 2001) (Tabela 8).

Tabela 8: Matriz de planejamento dos ensaios baseados no planejamento fatorial 2^3

Ensaio	Concentração de HNO_3 (mol L ⁻¹)	Tempo (horas)	Temperatura (°C)
N1	Lodo biológico		
N2	-* (1)	- (6)	- (40)
N3	+* (6)	- (6)	- (40)
N4	- (1)	+ (12)	- (40)
N5	+ (6)	+ (12)	- (40)
N6	- (1)	- (6)	+ (60)
N7	+ (6)	- (6)	+ (60)
N8	- (1)	+ (12)	+ (60)
N9	+ (6)	+ (12)	+ (60)
N10	(3)	(9)	(50)

*Os pontos negativos (-) e positivos (+) descritos equivalem aos limites inferiores (-) e superiores (+) do planejamento 2^3

3.1.3.2 Cálculo dos Efeitos e Interações

À partir da matriz de planejamento foi elaborada a Tabela de coeficientes de contraste multiplicando os sinais das colunas apropriadas para obter as colunas correspondendo às interações. Tem-se então, além dos três efeitos principais **1** (Concentração), **2** (Tempo) e **3** (Temperatura), três interações de dois fatores, **12**, **13**, e **23**. Como existem três fatores, o efeito de interação de dois deles em princípio depende do nível do terceiro. A interação **12**, por exemplo, terá um certo valor quando o fator **3** estiver no nível (+), e possivelmente um outro valor quando ele estiver no nível (-), este é então o efeito de interação entre os três fatores, **123**.

Efeitos principais:

1 - Concentração;

2 - Tempo;

3 - Temperatura.

Efeitos de Interações:

- 12 - Concentração x Tempo;
- 13 - Concentração x Temperatura;
- 23 - Tempo x Temperatura;
- 123 - Concentração x Tempo x Temperatura.

A Tabela 9 contém todos os sinais necessários para o cálculo dos efeitos principais e das interações.

Os sinais para calcular cada efeito são obtidos multiplicando-se as três colunas 1, 2 e 3 (efeitos principais) correspondendo às interações 12, 13, 23 e 123. Acrescentando mais uma coluna de sinais positivos para o cálculo da média, tem-se ao todo $2^3 = 8$ colunas obtendo-se os coeficientes de contraste (Tabela 9) (Barros Neto e colaboradores, 2001). Todas as colunas da Tabela 9 têm quatro sinais positivos e quatro sinais negativos. Isto significa que se pode interpretar qualquer efeito como a diferença entre duas médias, cada uma contendo metade das observações. Portanto, o cálculo dos efeitos principais e das interações é realizado se utilizando a média das respostas cujo coeficiente de contraste é positivo menos a média das respostas cujo coeficiente de contraste é negativo.

A resposta utilizada para calcular os efeitos foi as áreas calculadas a partir dos espectros em Absorbância de FTIR obtidos para cada ensaio.

Tabela 9: Coeficientes de contraste para um fatorial 2^3

Ensaio	Efeitos e Interações							Média
	1	2	3	12	13	23	123	
1	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	-	-	-	-	+	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+	+
4	+	+	-	+	-	-	-	+
5	-	-	+	+	-	-	+	+
6	+	-	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

3.1.3.3 Análise por meio de Gráficos Normais

A partir de um gráfico normal, se verifica que os pontos centrais se ajustam muito bem a uma reta que cruza a probabilidade acumulada de 50% praticamente sobre o ponto zero dos eixos das abscissas. Faz sentido, portanto, considerar esses pontos como vindos de uma população normal de média zero, eles representam efeitos sem nenhum significado físico.

O mesmo não é válido para os valores que ficam afastados do centro. Dificilmente se pode pensar que esses pontos, tão afastados da reta, pertencem à mesma população que produziu os pontos centrais. Deve-se interpretá-los como efeitos realmente significativos, e tanto mais significativos quanto mais afastados estiverem da região central, seja para a direita, seja para a esquerda.

Os gráficos normais também ajudam a avaliar a qualidade de um modelo qualquer, seja ele relacionado com um planejamento fatorial ou não. Um modelo bem ajustado aos fatos, qualquer que seja sua natureza, deve ser capaz de representar toda a informação sistemática contida nos dados. Os resíduos deixados por ele devem representar apenas a parte aleatória, isto é, o “ruído” embutido nas medições. O aspecto do gráfico normal desses resíduos deve ser compatível com o que se esperaria de uma amostra aleatória extraída de uma distribuição normal de média zero, isto é, deve se aproximar de uma reta passando pelo ponto $(x, y) = (0,0)$.

Para melhor visualização dos fatores que são significativos ou não, utilizando uma escala linear comum, foi traçado um gráfico normal colocando no eixo das abscissas os valores dos efeitos e no eixo das ordenadas o fator Z (valor correspondente ao ponto central da probabilidade cumulativa na distribuição normal padronizada) (Barros Neto e colaboradores, 2001).

3.1.3.4 Planejamento em Estrela

Realizando o cálculo dos efeitos para o fatorial 2^3 , verificou-se que o efeito da temperatura não é um fator tão significativo, por isso ele foi excluído do planejamento em estrela. A partir das superfícies de resposta, se observou que o

ensaio que obteve maior resposta (nitração/oxidação) foi o realizado com uma concentração de HNO_3 de 1 mol L^{-1} , temperatura de 40°C e tempo de reação de 6 horas. Desta forma se utilizou este ponto como central no planejamento em estrela.

A Tabela 6 representa os fatores Concentração de HNO_3 e Tempo e os níveis estudados ($+2^{1/2}$, $+1$, 0 , -1 e $-2^{1/2}$). O ponto central corresponde aos valores $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ e 6 horas e os demais ensaios, que estão a uma distância $2^{1/2}$ deste ponto, são apresentados na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10: Fatores e níveis estudados no planejamento em estrela

Fatores	$+2^{1/2}$	$+1$	0	-1	$-2^{1/2}$
Concentração de HNO_3	1,56	1,40	1,00	0,60	0,43
Tempo	10,0	8,83	6,00	3,17	2,00

A Tabela 11 mostra a matriz dos ensaios que representa os ensaios realizados no planejamento em estrela.

Tabela 11: Matriz dos ensaios no planejamento em estrela

Ensaio	Concentração de HNO_3 (mol L^{-1})	Tempo (horas)
PE1	Lodo biológico	
PE2	-1	-1
PE3	1	-1
PE4	-1	1
PE5	1	1
PE6	0	0
PE7	$-2^{1/2}$	0
PE8	0	$2^{1/2}$
PE9	$2^{1/2}$	0
PE10	0	$-2^{1/2}$

(Barros Neto e colaboradores, 2001)

3.1.3.5 Superfície de Resposta

Os gráficos de superfícies de resposta foram realizados em programa Matcad, a partir de matrizes de dados que continham os níveis estudados de concentração e tempo (-1.414, -1, 0, 1 e 1.414) e as respostas obtidas a partir das áreas dos espectros de infravermelho.

Todos os ensaios foram realizados a temperatura de 40 °C. Nos gráficos do planejamento em estrela o sistema de eixos continuou o mesmo do planejamento fatorial 2³. No eixo das abscissas, concentração de HNO₃ e no eixo das ordenadas, tempo de reação. A concentração de HNO₃ variou de 0,43 a 1,56 mol L⁻¹ e o tempo de reação variou de 2 a 10 horas.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS – EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO

3.2.1 Solo

Latossolo vermelho (brúncio), localizado a 1028 m de altitude, na latitude de 24°51'24"S, longitude de 49°55'50", relevo regional suave ondulado coletado na fazenda experimental da Fundação ABC para assistência técnica e divulgação agropecuária, Castro, PR.

Na figura 10 a seguir têm-se as diferentes situações: Campo nativo (área de vegetação natural de campo, sem revolvimento); campo aberto (de onde não foram coletadas amostras); mata (área com vegetação natural típica com presença de araucária) e; plantio direto (a mais de 12 anos sob plantio direto, com rotação nos últimos anos de soja/aveia preta cobertura / milho / trigo).

As amostras foram coletadas a profundidade de 0 – 10 cm.

Figura 10: Visão panorâmica das áreas coletadas para a análise



3.2.2 Equipamentos, materiais e reagentes

Resina XAD-8 fornecidos por Rohm e Haas;

Resina IR-120 fornecido por Sigma;

NaOH em grânulos (grade GPR) fornecido por Fisons;

Etanol (99% pureza) fornecido por BDH/Merck;

Acetonitrila (grade GPR) fornecida por Fisons;

Pirofosfato de Sódio fornecido por Aldrich;

HCl – classe industrial fornecido por Fisons.

HCl - classe analítica fornecido por Fisons.

Frascos “Winchester” (2, 5 L);

Rolo fornecido por Pascall Engineering de Crawley;

Membrana de diálise com um “cutoff” de peso molecular (MWCO) de 12000 daltons.

Bombas peristálticas fornecidas por Cole-Palmer Masterfiex.

3.2.2.1 Filtração

Os reservatórios foram conectados aos suportes do filtro pelos encaixes flexíveis da tubulação. Os filtros de membrana de acetato de celulose (142 milímetros de diâmetro com 0,45 µm e 0,2 µm de tamanho de poro, respectivamente) foram usados para filtrar as amostras. Estas amostras foram filtradas sob pressão de 10 libras por polegada quadrada. A solução filtrada foi coletada. O sedimento preso à superfície dos filtros foi coletado e armazenado.

3.2.2.2 Colunas

As colunas (1,5 e 9 litros de capacidade) de vidro foram fechadas nas pontas com placas de Teflon. Dois tamanhos de coluna foram usados: colunas de 9 L foram empacotadas com XAD-8 e a coluna de 1,5 L foi empacotada com IR-120. Todas as tubulações eram de Teflon, à exceção da tubulação de silicone (20 cm) no início da bomba peristáltica.

3.2.3 Preparação da resina XAD

É vital ao sucesso do trabalho que as resinas usadas no procedimento da extração estejam limpas corretamente e completamente. As resinas limpas inadequadamente podem originar grandes quantidades de artefatos proveniente dos contaminantes da resina nos isolados húmicos (Malcolm, 1991).

Os fabricantes das resinas XAD, Rohin e Haas (1983), recomendam que um tratamento pré-condicionante seja usado para remover todos os traços de agentes preservativos e de compostos monoméricos residuais. Indicam também que adsorventes poliméricos Amberlite são produtos de classe industrial e que não são sugeridos seus usos em aplicações analíticas, diagnósticas ou farmacêuticas sem purificações extensivas (Rohin e Haas, 1981). O procedimento de limpeza da resina que foi usado é sumariado a seguir:

- 1) Remoção dos finos;

- 2) Lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ (mínimo 10 dias);
- 3) Enxaguar com água;
- 4) Lavagem com etanol quente;
- 5) Enxaguar com água;
- 6) Lavagem com acetonitrila quente;
- 7) Enxaguar com água;
- 8) Lavagem com NaOH de 0,1 mol L⁻¹;
- 9) Enxaguar com água;
- 10) Lavagem com acetonitrila quente;
- 11) Enxaguar com água;
- 12) Lavagem com etanol quente;
- 13) e finalmente as resinas são armazenadas em etanol.

O procedimento de limpeza em detalhes esboçado a seguir foi utilizado para cada uma das três resinas.

- 1) Deixou-se a resina hidratar por pelo menos um dia.
- 2) Os finos foram removidos pela adição de água, agitando, permitindo que os grânulos assentem-se (precipitem), removendo o sobrenadante (e os finos) sob sucção de vácuo.
- 3) A resina foi rolada em frasco “winchester” com NaOH 0,1 mol L⁻¹. A base foi decantada, adicionou-se NaOH e o processo de rolagem e de decantação foi repetido por 10 dias. A resina não deve ser armazenada em NaOH por períodos prolongados porque ocorrerá a hidrólise da mesma. Assim, a resina foi armazenada em água destilada durante a noite durante o período de lavagem com solução de NaOH.
- 4) A resina foi enxaguada completamente com água destilada para remover todos os traços de NaOH.
- 5) Etanol quente foi adicionado ao “winchester” que contém a resina, e a mistura foi rolada por uma hora. O etanol então foi removido e recuperado por destilação. O processo foi repetido ao menos dez vezes.
- 6) O etanol residual foi removido enxaguando a resina com água destilada.

7) A lavagem com acetonitrila quente foi realizada da mesma forma que a lavagem com etanol. Pelo menos 10 lavagens foram necessárias e os processos foram realizados em capela.

8) Todos os traços da acetonitrila foram removidos enxaguando a resina com água destilada.

9) Um ciclo completo foi repetido. Depois da última lavagem, etanol foi adicionado à resina para prevenir crescimentos biológicos durante o armazenamento.

10) A resina então foi empacotada nas colunas de vidro e enxaguada com 75-100 volumes de coluna com água para remover todos os traços de etanol.

11) A coluna foi então lavada com um volume da coluna de NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), seguido por um volume da coluna de HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). O processo (NaOH e HCl) foi repetido, e um volume da coluna de HCl ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foi passado através da coluna. Assim, contaminantes solúveis hidrofóbicos que estejam em grandes volumes de água destilada sejam removidos. A coluna está agora pronta para processar a água.

A resina trocadora de cátions IR-120 (estireno divinil benzeno com funcionalidade ácida sulfônica), foi armazenada em água destilada, sendo regenerada antes de seu uso passando-se 15 volumes da coluna de HCl (10%) em peso através da resina. Antes de se eluir a amostra na resina IR-120, o HCl é lavado usando água destilada, até que a condutividade da água destilada, que entra na coluna, seja a mesma que a condutividade que sai.

A fim de se evitar a contaminação proveniente do sangramento da resina, é importante que durante a operação de limpeza, a resina deve ser limpa com os grupos de solventes que serão usados subsequente durante o procedimento de isolamento. A resina limpa é empacotada a aproximadamente 90 % da capacidade da coluna cromatográfica de vidro fechada com as placas terminais de teflon, as válvulas e a tubulação. A coluna é lavada então com 75 a 100 volumes da coluna de água destilada para remover todos os traços do etanol (Malcolm, 1991). As propriedades de sorção da resina, para a maioria dos solutos, são diminuídas em misturas de água-etanol. Uma amostra do enxágüe final deve ser

feita para verificar o teor de carbono orgânico dissolvido (COD), e este deve ser menos que $0,5 \text{ mg C L}^{-1}$.

3.2.4 Procedimento de extração usado no isolamento de substâncias húmicas de solo

Ao solo seco (aproximadamente 1 kg de solo) foi adicionado $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 - 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ajustado a pH 7,6 utilizando-se $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O solvente extrator foi adicionado ao solo a uma razão de $\sim 2 \text{ L}$ de solução extratora para 1 kg de solo. Após, a amostra foi rolada por aproximadamente 4 horas para maior contato do solvente extrator com o solo. Após, esta mistura é deixada em descanso por $\sim 15 \text{ min}$, para separação bruta do sobrenadante do material sólido. O sobrenadante foi decantado e então, centrifugado duas vezes, sendo a primeira a 8000 rpm, por 20 min a 40°C e a segunda a 12000 rpm, por 20 min a 40°C . Após, esta solução que foi centrifugada, é filtrada (membrana de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$) usando aparato de filtros "Millipore" (filtro de acetato de celulose) sob 10 psi de ar. Este processo de filtração sob pressão foi realizado duas vezes em cada amostra. Os filtros foram limpos duas, três ou até mais vezes ao dia, conforme a necessidade. O precipitado, proveniente da centrifuga, foi readicionado à amostra inicial (solo + solução extratora) para a próxima extração (2ª extração a mesmo pH). O solo foi novamente extraído, apenas ajustando-se o pH do mesmo a 7,6 com NaOH , sem a adição de pirofosfato de sódio, sendo este processo repetido mais uma vez a pH 7,6 (3ª extração a mesmo pH); isto é, foram realizadas três extrações a pH 7,6 sendo que somente na primeira adicionou-se $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 - 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na segunda e terceira, o pH apenas foi ajustado a 7,6.

Ao mesmo solo foi então adicionado $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 - 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ajustado a pH 10,6 com NaOH . Os processos de extração foram repetidos como descritos acima. Anteriormente ao passo filtro de acetato de celulose, o pH da solução foi ajustado a pH 7, usando-se $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$, prevenindo-se assim a oxidação do material. Este processo foi repetido três vezes, como já citado, na primeira extração a pH

10,6, adicionou-se $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 - 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na segunda e terceira, o pH da solução apenas foi ajustado a 10,6 utilizando-se $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$.

O solo foi então extraído utilizando $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 - 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ajustando-se o pH a 12,6 com NaOH . Os processos seguintes devem ser rápidos o suficiente para que não ocorra a oxidação da amostra ou então serem realizados sob atmosfera de N_2 . Após a centrifugação, o pH do sobrenadante centrifugado foi novamente neutralizado a pH 7,0 usando $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ e filtrado. Esta extração também foi repetida três vezes, como já citado acima.

A seqüência de solventes utilizada neste trabalho encontra-se a seguir:

Pirofosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 7,6);

Pirofosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 10,6);

Pirofosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 12,6).

Os extratos foram subsequentemente centrifugados e passados por filtros de pressão (filtros de $0,2 \mu\text{m}$) e o pH dos extratos foi reduzido a < 2 utilizando-se $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ causando assim a precipitação dos AH; estes são separados do sobrenadante (AF) por cuidadosa sifonação como será visto posteriormente.

3.2.5 Fracionamento das substâncias húmicas seguindo uma modificação do procedimento sugerido pela IHSS

Como citado acima, o filtrado extraído (após filtro sob pressão de Argônio onde foi utilizado filtro de acetato de celulose) foi coletado em becker de 5 L e acidificado a $\text{pH} < 2$ utilizando-se $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ e foi deixado em descanso por uma noite em refrigerador a 4°C . Esta baixa temperatura facilita a separação das frações desejadas. Desta forma, tem-se a separação das frações ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF). O precipitado AH foi então separado da fração AF através de cuidadosa sifonação do sobrenadante AF, desta forma, não se perturba a fração AH precipitada e depositada no fundo do becker. A fração AF foi novamente filtrada sob pressão para retirar qualquer resíduo de AH da mesma, sendo que este resíduo proveniente do filtro foi coletado e adicionado à fração AH.

O AF foi então passado pela XAD-8 e IR-120, tratado e recuperado como descrito no item Isolamento de frações húmicas usando a resina XAD-8.

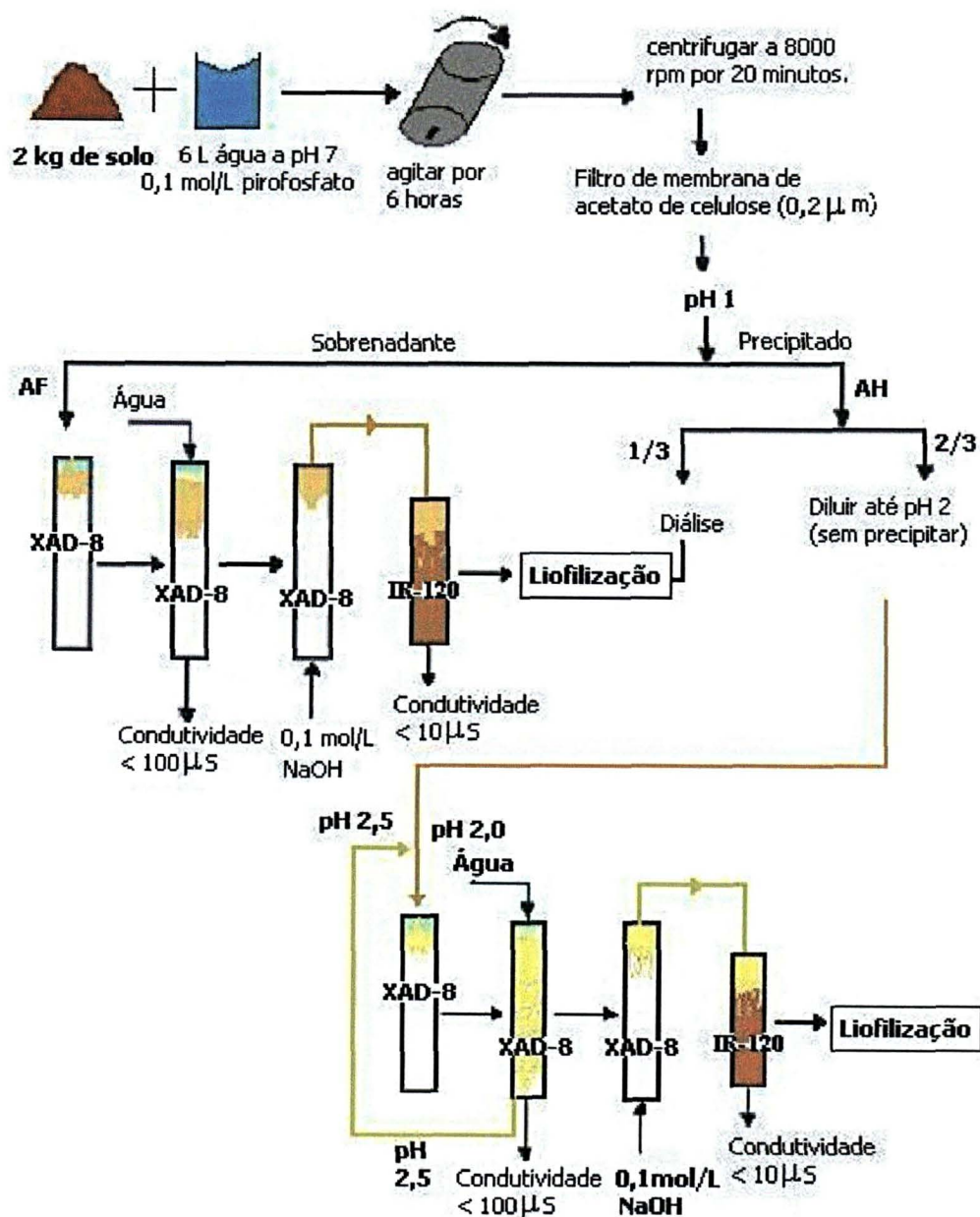
3.2.5.1 Diálise dos AH

A fração AH foi dialisada, utilizando-se membranas de diálise. Inicialmente estas membranas foram lavadas com água destilada e então preenchidas com a fração AH. A amostra foi dialisada contra água destilada, sendo que esta água foi trocada uma vez ao dia, até que nenhum precipitado de AgCl fosse obtido ao adicionar-se solução de nitrato de prata a uma alíquota da água de diálise. Aproximadamente 1/3 do AH foi então passado pela resina XAD-8 e IR-120, tratado e recuperado como descrito no item a seguir. O restante desta fração AH (aproximadamente 2/3 foi congelado a seco - liofilizado diretamente).

3.2.6 Isolamento de frações húmicas usando as resinas XAD-8 e XAD-4 no procedimento em “tandem”

Os AH foram diluídos em água destilada a uma concentração de matéria orgânica $< 15 \text{ mg L}^{-1}$ e lentamente ajustados a $\text{pH} \sim 2$, utilizando-se $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$. Após, as soluções foram bombeadas de cima para baixo na resina XAD-8 em uma velocidade de fluxo de ca. 40 mL min^{-1} . Após aproximadamente 2 volumes da coluna de água (um volume de coluna é de aproximadamente 5 L) foi passado através da mesma, sendo que água destilada foi bombeada através da coluna até que a condutividade do efluente fosse $< 50 \text{ mS cm}^{-1}$. Esta água destilada foi bombeada através das colunas para “lavar” materiais residuais sorvidos pelas resinas como sais inorgânicos. Após, a coluna XAD-8 foi então bombeada no sentido inverso, ou seja, de baixo para cima, utilizando-se $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, o efluente colorido (“center-cut”) foi então coletado e passado através da coluna que continha a resina IR-120 (forma protonada) e o eluente desta resina IR-120 foi então congelado a seco (liofilizado) (Figura 11). Ao final, a resina XAD-8 foi lavada com $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 11: Procedimento seqüencial de extração usando solventes aquosos a diferentes valores de pH usado no isolamento e fracionamento das SH



3.3 MATERIAIS E MÉTODOS - MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR foram registrados em temperatura ambiente e em baixa temperatura (77 K) de N₂ líquido, em espectrofotômetro Bruker ESP 300E operando em Banda-X (9,5 GHz) empregando 100 kHz de frequência de modulação do campo magnético. Os valores dos parâmetros de EPR foram obtidos por tratamento e simulação dos espectros experimentais com o auxílio dos programas de computador Win-EPR® e SimFonia®. O equipamento utilizado para esta análise encontra-se no LABEPR, Depto. de Química, UFPR.

Utilizando-se os espectros das amostras em estudo em varredura de campo magnético 30 G e o espectro, também em 30 G, de uma amostra padrão de quantidade de radical livre orgânico (RLO) determinada, "Strong Pitch" com, 3,6667 e 15 spins cm⁻¹, foi calculado o número de spins g⁻¹ das amostras estudadas através de tratamento matemático adequado, cuja equação é a seguinte:

$$S_{AM} \times n^{\circ} \text{ spin cm}^{-1} \text{ SP} = S_{SP} \times n^{\circ} \text{ spin cm}^{-1} \text{ AM}$$

$$n^{\circ} \text{ spin cm}^{-1} \text{ AM} = S_{AM} \times n^{\circ} \text{ spin cm}^{-1} \text{ SP} / S_{SP}$$

onde: S_{AM} = área sob a curva da absorção da amostra;

$n^{\circ} \text{ spin cm}^{-1} \text{ SP}$ = número de spins do padrão "strong pitch" (SP) por cm;

S_{SP} = área sob a curva de absorção do padrão SP;

$n^{\circ} \text{ spin cm}^{-1} \text{ AM}$ = número de spins da amostra (AM) por cm;

Como a amostra (AM) é pesada, transforma-se a sua altura no tubo de EPR em massa e, também, o valor $n^{\circ} \text{ spin cm}^{-1} \text{ AM}$ em $n^{\circ} \text{ spin g}^{-1} \text{ AM}$.

3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T) e DRIFT

Os espectros de FTIR por transmitância (T) foram registrados em espectrofotômetro Bomem FTIR, série MB100 utilizando-se pastilhas de KBr obtidas por prensagem de misturas preparadas com aproximadamente 1 mg de amostra e 99 mg de KBr de grau espectroscópico. Para cada espectro foram acumuladas 32 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} , na região de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$.

Para as análises de infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa (DRIFT), das amostras de AH e AF extraídas de solo a diferentes pH (7,6, 10,6 e 12,6), os espectros de infravermelhos foram obtidos usando o acessório de reflectância difusa na região de $7500\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 2 cm^{-1} e 256 varreduras. As medidas foram realizadas em espectrômetro BIORAD FTS 3500GX, modelo EXCALIBUR. Estas análises foram realizadas no Depto. de Química, UFPR.

3.3.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Esta análise foi efetuada com amostras em estado sólido e líquido em todas as amostras dos experimentos de nitratação e redução, antes do tratamento desta com HCl, pois a solução $0,05\text{ mol L}^{-1}$ de KHCO_3 é adequada para este tipo de análise (MARTIN-NETO e colaboradores, 1991). As análises de UV-VIS sólidas foram realizadas em espectrofotômetro modelo UV-2401CP.

3.3.4 Análise Elementar de C H N S

As análises de C, H, N, S foram realizadas no Laboratório de Microanálise do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. O equipamento utilizado foi o Fisons modelo EA 1108 CHNS. As amostras foram pesadas com precisão de $1\text{ }\mu\text{g}$ ($0,000001\text{g}$) dentro de uma pequena cápsula de estanho. Essa cápsula contendo a amostra foi para tubo reator de quartzo,

preenchido com um oxidante e um redutor, à temperatura de 1020 ° C, sendo então injetado oxigênio puro, o que eleva a temperatura para 1800 ° C. Esse processo é chamado de combustão flash. Por esse tubo reator passa uma corrente de hélio que arrasta os gases resultantes da combustão pelos reagentes (oxidante e redutor). Se tudo estiver correto todo o carbono vai a CO₂, todo nitrogênio vai a N₂, todo hidrogênio vai a H₂O e todo enxofre vai a SO₂, que são levados até um cromatógrafo gasoso com uma coluna empacotada com porapak, que separa os gases e estes são detectados com um detector de condutividade térmica. Gerado o cromatograma, os picos são integrados e, com base em suas áreas e em curvas de calibrações obtidas com padrões certificados é emitido o resultado.

3.3.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (¹³C CPMAS NMR)

Para a análise de ¹³C CPMAS NMR as amostras de AH e AF foram postas em um rotor de zircônio de 7 mm de diâmetro com um tampão de Kel-F. Os espectros foram registrados em frequência de ¹³C de 75 MHz em espectrômetro Bruker DSX-300 em velocidade de giro de 4,5 kHz. Os comprimentos de pulso de ¹H, 90° e ¹³C, 180° foram de 3 e 6 µs, respectivamente. No eco de spin Hahn, mais um período curto de 10 µs ou preferivelmente um período de rotação de 77 µs, foram empregados como o atraso pré-eco para evitar distorções da linha de base. O sincronismo exato do começo da detecção para espectros não distorcidos foi determinado em um modelo, composto de mistura de aminoácidos marcado com ¹³C, com sinais em ambos os lados da faixa de mudança química para ¹³C. Estas análises foram feitas no Departamento de Química da Universidade do Estado de Iowa, Ames, USA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO – INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO

4.1.1 Planejamento e Otimização dos Dados para Nitração

4.1.1.1 Planejamento Fatorial 2^3

4.1.1.1.1 Planejamento Fatorial 2^3 - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A Tabela 12 mostra a concentração de radicais livres orgânicos (RLO) calculados através da técnica de EPR para os ensaios do planejamento fatorial 2^3 . A aquisição dos dados de RLO segue a metodologia descrita no item 3.3.1.

Tabela 12: Concentração de radicais livres orgânicos (RLO) observados por EPR nas amostras de lodo biológico puro, nitrado e reduzido estudadas

Ensaio		RLO (spins g ⁻¹)
N1	Lodo biológico*	1,22e17
N2	1M06H40*	8,82e17
N3	6M06H40*	8,43e16
N4	1M12H40*	1,58e17
N5	6M12H40*	6,07e17
N6	1M06H60*	1,32e16
N7	6M06H60*	8,85e16
N8	1M12H60*	4,57e16
N9	6M12H53*	6,73e16
N10	3M09H50*	9,63e16
N11*	1M06H40RE**	8,60e16

Ensaio N1 a N10 encontram-se detalhados na Tabela 8, item 3.1.3.1. ** O ensaio N11 (1M06H40RE) refere-se a amostra nitrada/oxidada/reduzida com SnCl₂ segundo item 3.1.2.

Observou-se que os ensaios onde se utilizou a temperatura de 40 °C (N2, N3, N4 e N5) foram os que obtiveram os maiores valores de RLO e que dentre eles os ensaios N2 e N5 foram os que apresentaram os maiores valores de RLO dentre estes quatro ensaios. Sugere-se que, ao se utilizar a temperatura de 60 °C, houve maior quebra de moléculas com tamanho menor que foram para a solução.

Os espectros da amostra do lodo biológico e das amostras nitradas nas condições apresentadas na Tabela 12 encontram-se na Figura 12 a seguir. Nesta Figura 12 observa-se que os espectros de todas as amostras acima citadas, obtidos na faixa de campo de 0 a 5000 G, a temperatura ambiente, apresentaram uma linha larga de absorção, na região de $g \sim 2,0$, atribuída a sais de Fe^{3+} e óxidos de Fe^{3+} em domínios concentrados. Todas as amostras apresentaram ressonância em $g = 4,3$, indicando a presença de íons Fe^{3+} em domínios diluídos (Schreiner e colaboradores, 2001).

Em todos os espectros da Figura 12 verifica-se uma linha de absorção de radical livre orgânico (RLO) em $g \sim 2,0$, que pode ser melhor observada nos espectros a 30 G em temperatura ambiente (TA) (Figura 14).

A amostra lodo biológico (N1) e a amostra N10 apresentaram complexos de Mn^{2+} em estruturas de esfera externa (Figura 12). Estes complexos são melhor visualizados em baixa temperatura (77K) na Figura 13.

A amostra lodo biológico (N1) apresentou parâmetros de EPR correspondente a complexos de Fe^{3+} porfirina, com $g \sim 6,0$ (GOODMAN e HALL, 1994) e $g \sim 5,0$ correspondente à presença de íons Fe^{3+} em domínios diluídos (Schreiner e colaboradores, 2001) (Figura 12).

Na Figura 13 observam-se os espectros obtidos em baixa temperatura (77K). Verifica-se o aumento da intensidade dos sinais na região de $g \sim 2,0$ referentes a RLO e na região de $g = 4,3$ referentes a íons Fe^{3+} em domínios diluídos e a diminuição da intensidade dos sinais referentes a íons Fe^{3+} em domínios concentrados.

Figura 12: Espectros de EPR das amostras estudadas a 5000 G a 300 K

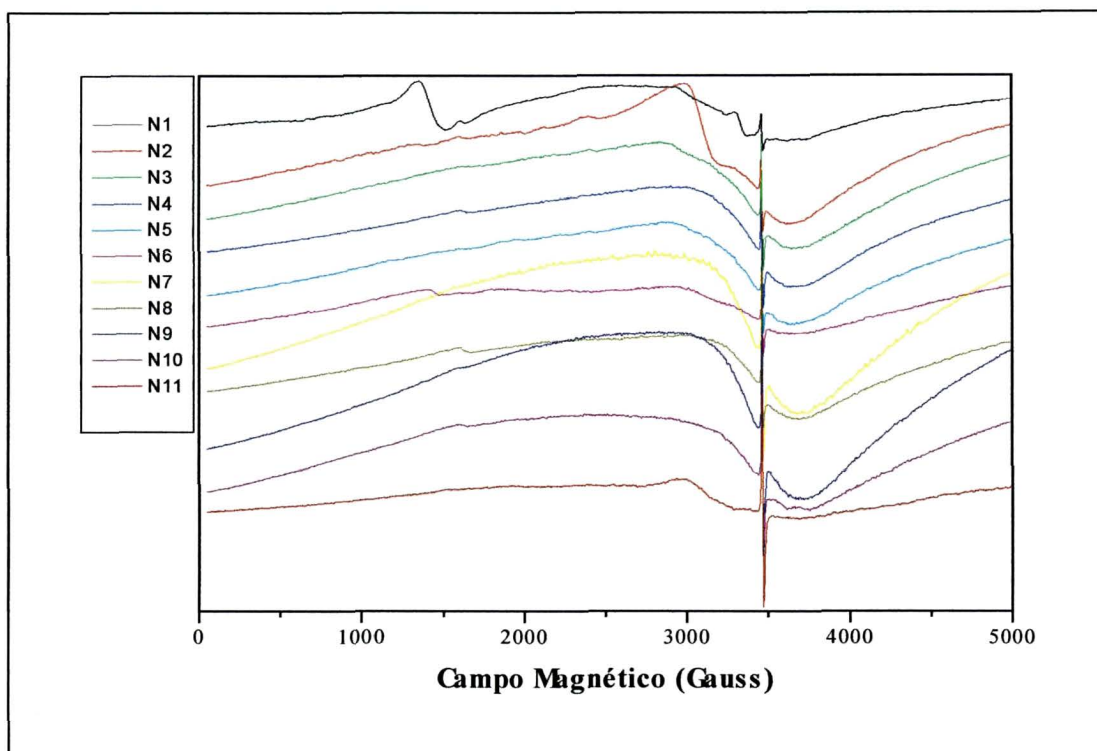


Figura 13: Espectros de EPR das amostras estudadas a 5000 G a 77K

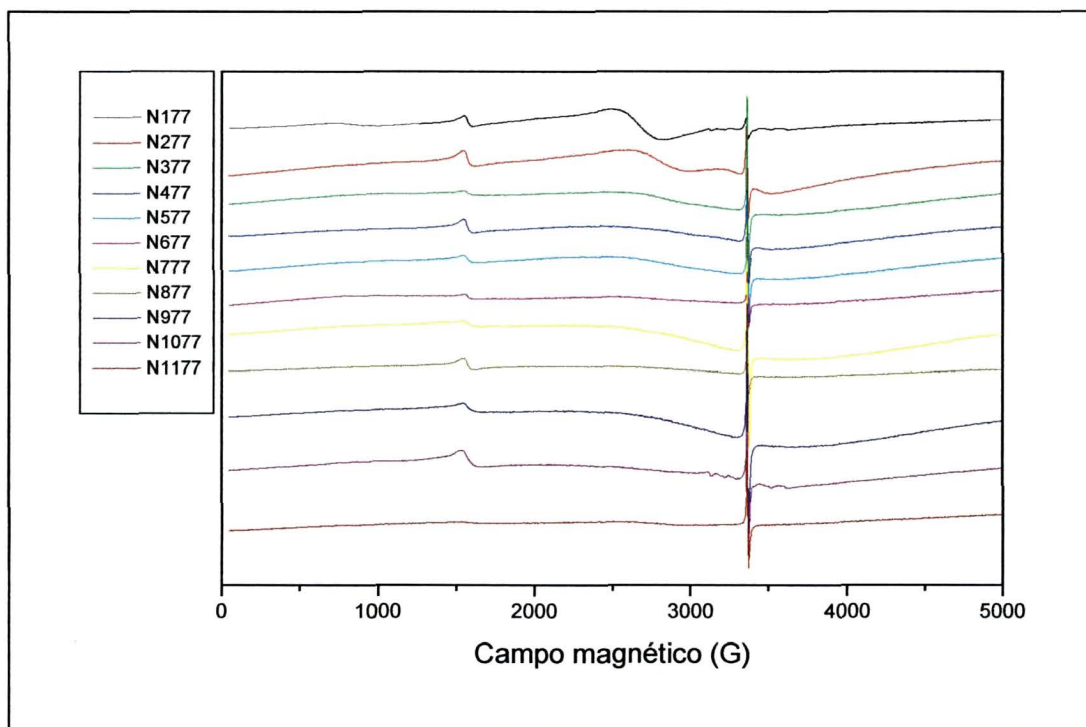
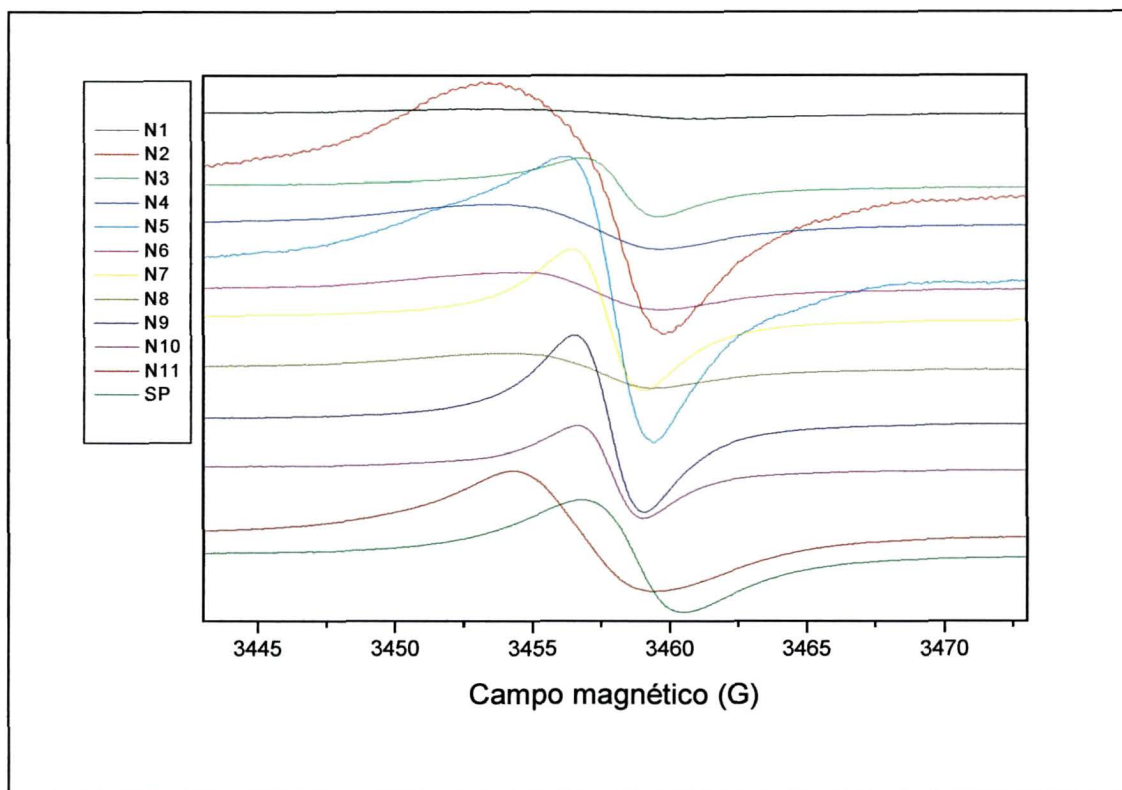


Figura 14: Espectros de EPR das amostras estudadas a 30 G a 300 K



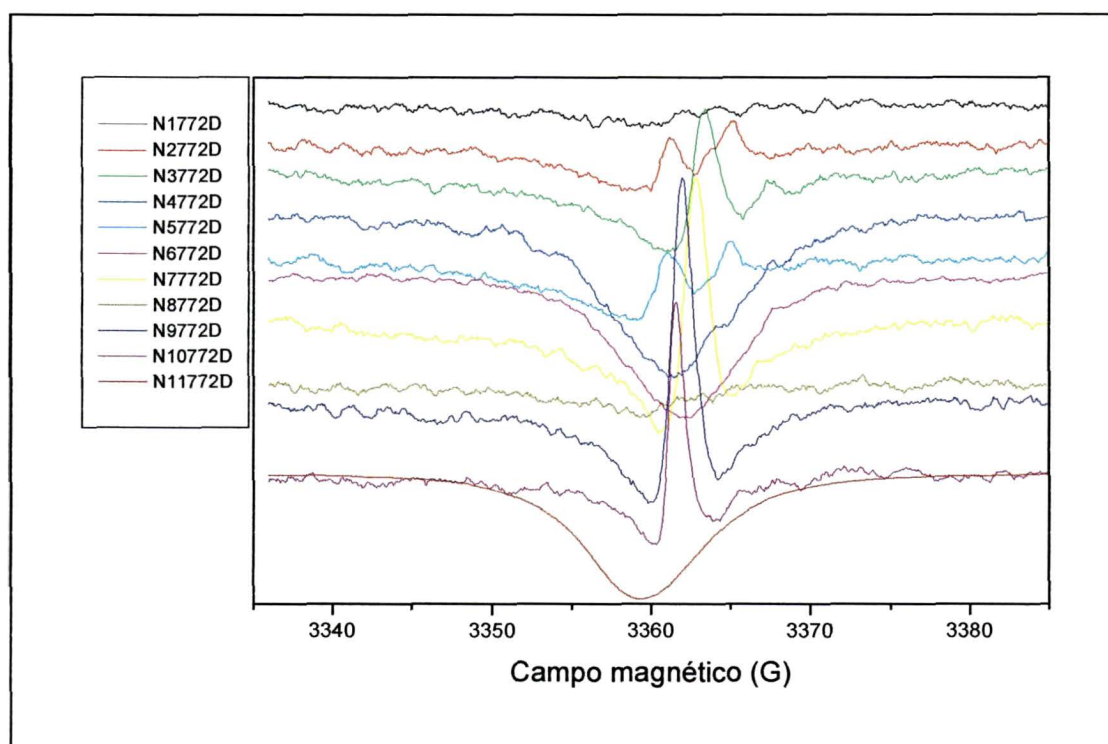
A Figura 15 mostra os espectros obtidos em baixa temperatura (77K) e em segunda derivada (2D). Os espectros das amostras N5772D e N2772D apresentaram dois sinais na região de RLO sugerindo que um deles estaria ligado a grupos NO_2 e outro não. O espectro da amostra lodo biológico (N1) (Figura 14) apresentou sinais referentes à presença de estruturas de para-benzosemiquinonas, com $g = 2,0038$ (Pedersen, 1985).

Na Figura 16 observa-se a amostra lodo biológico (N1) em temperatura ambiente (TA) (N1TA) e em baixa temperatura (77K) (N177). Na N1TA se observa mais claramente os sinais referentes a presença de RLO, os complexos de Mn^{2+} em estruturas de esfera externa e os sinais referentes aos íons Fe^{3+} em domínios diluídos já mencionados. Na N177 verifica-se a intensificação destes sinais.

Os espectros em temperatura ambiente (N2TA) e em baixa temperatura (77K) (N277) da amostra nitrada com 1 mol L^{-1} , 6 horas e 40°C são melhor visualizados na Figura 17 onde se observa sinais referentes à presença de RLO e

íons Fe^{3+} em $g = 4,3$ em domínios diluídos. Verifica-se o aumento da intensidade dos mesmos a 77K. Não há mais sinais de complexos de Mn^{2+} em estruturas de esfera externa tanto na N2TA como na N277 sugerindo que o processo de nitratação hidrolisou estes íons fracamente ligados às estruturas do material para a fração solúvel da amostra. Comparando-se os sinais de íons Fe^{3+} na amostra nitrada (N2TA) (Figura 17) com a amostra lodo biológico (N1) (Figura 16) observa-se a diminuição da intensidade dos mesmos sugerindo também que estes íons Fe^{3+} deslocaram-se para a fração solúvel da amostra.

Figura 15: Espectros de EPR das amostras a 50 G a 77 K em 2ª derivada*



* N (nitratação), 77 (77 Kelvin), 2D (segunda derivada)

Figura 16: Espectros de EPR da amostra pura a 5000 G em temperatura ambiente (TA) (N1TA) e 77 K (N177)

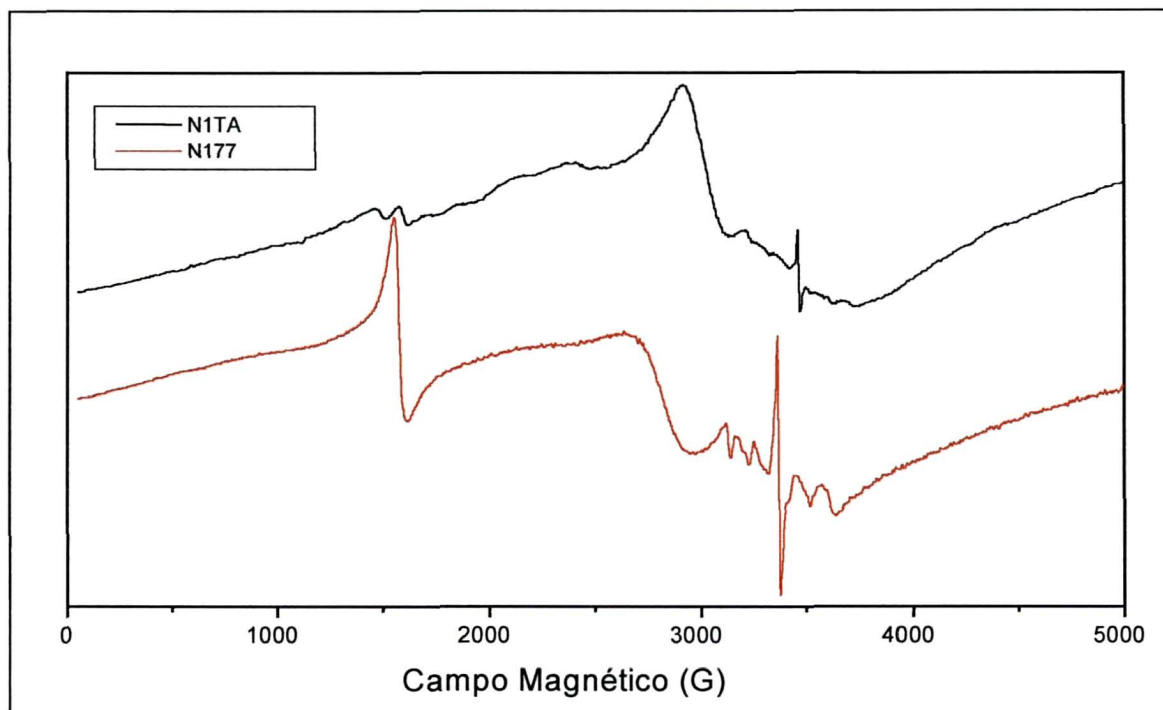
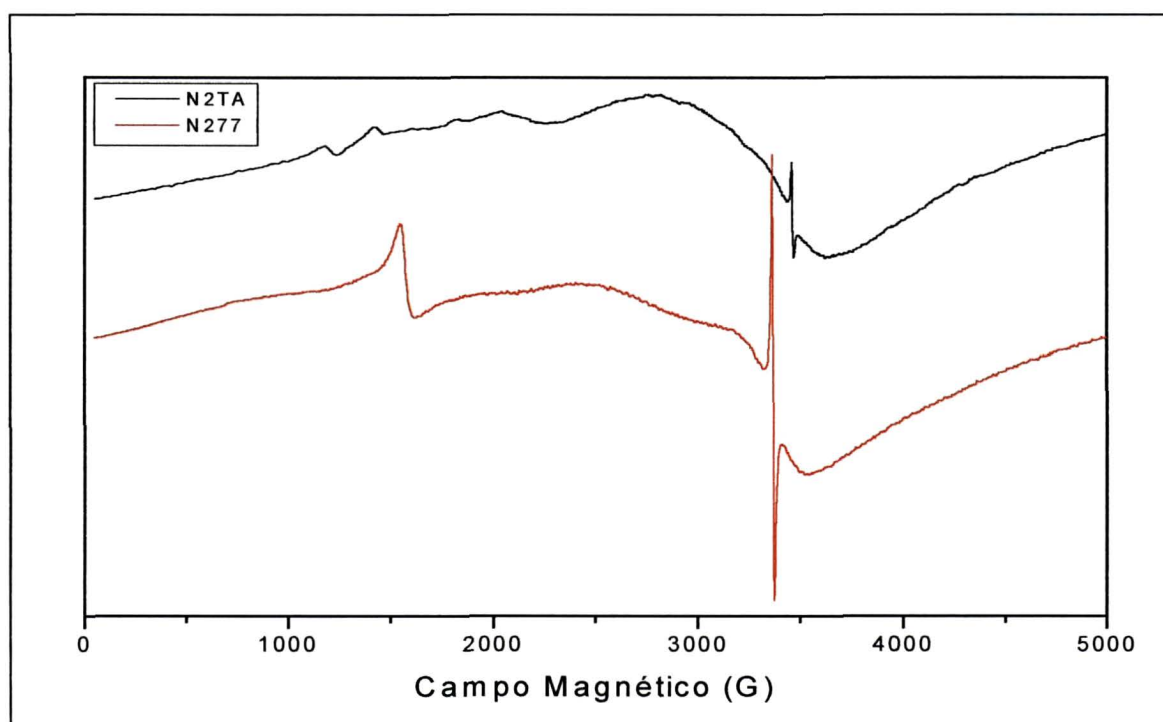


Figura 17: Espectros de EPR da amostra nitrada a 5000 G em temperatura ambiente (TA) (N2TA) e a 77 K (N277)



Na Figura 18 observa-se a amostra nitrada com 1 mol L^{-1} , 6 horas e 40°C e após reduzida com cloreto estânico (SnCl_2) em temperatura ambiente (TA) (N2RETA) e em baixa temperatura (77K) (N2RE77). Observa-se a diminuição da intensidade dos sinais referentes a íons Fe^{3+} e a intensificação dos sinais referentes a RLO, os quais podem ser melhor visualizados na Figura 19, sugerindo assim que este processo reduziu íons Fe^{3+} a íons Fe^{2+} que são “silenciosos” em EPR. O processo redox ocorrido seria:

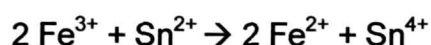


Figura 18: Espectros de EPR da amostra nitrada e reduzida a 5000 G em temperatura ambiente (TA) (N2RETA) e a 77 K (N2RE77)

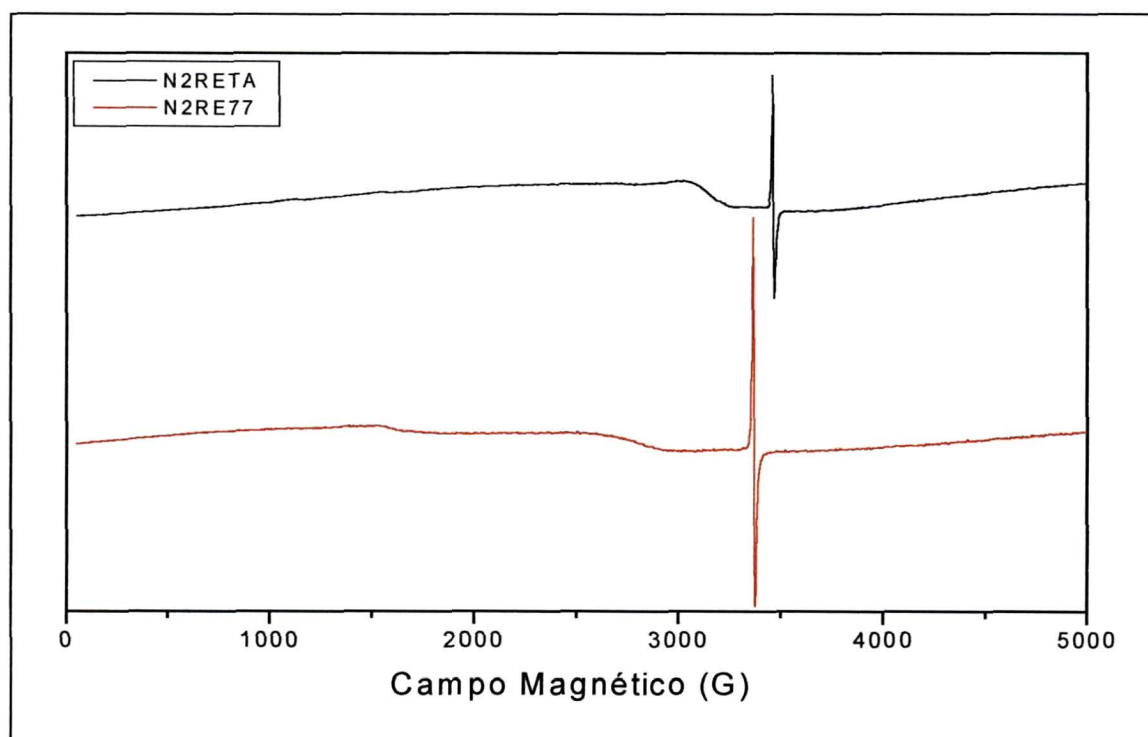
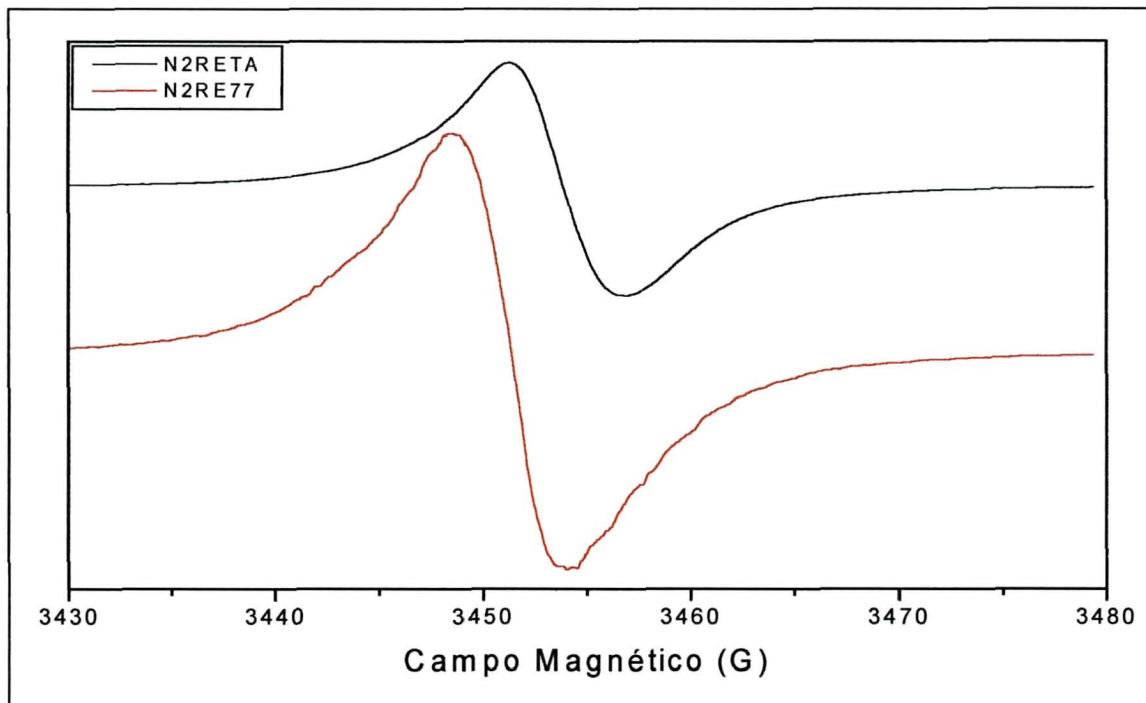


Figura 19: Espectros de EPR da amostra nitrada e reduzida a 50 G em temperatura ambiente (TA) (N2RETA) e a 77 K (N2RE77)

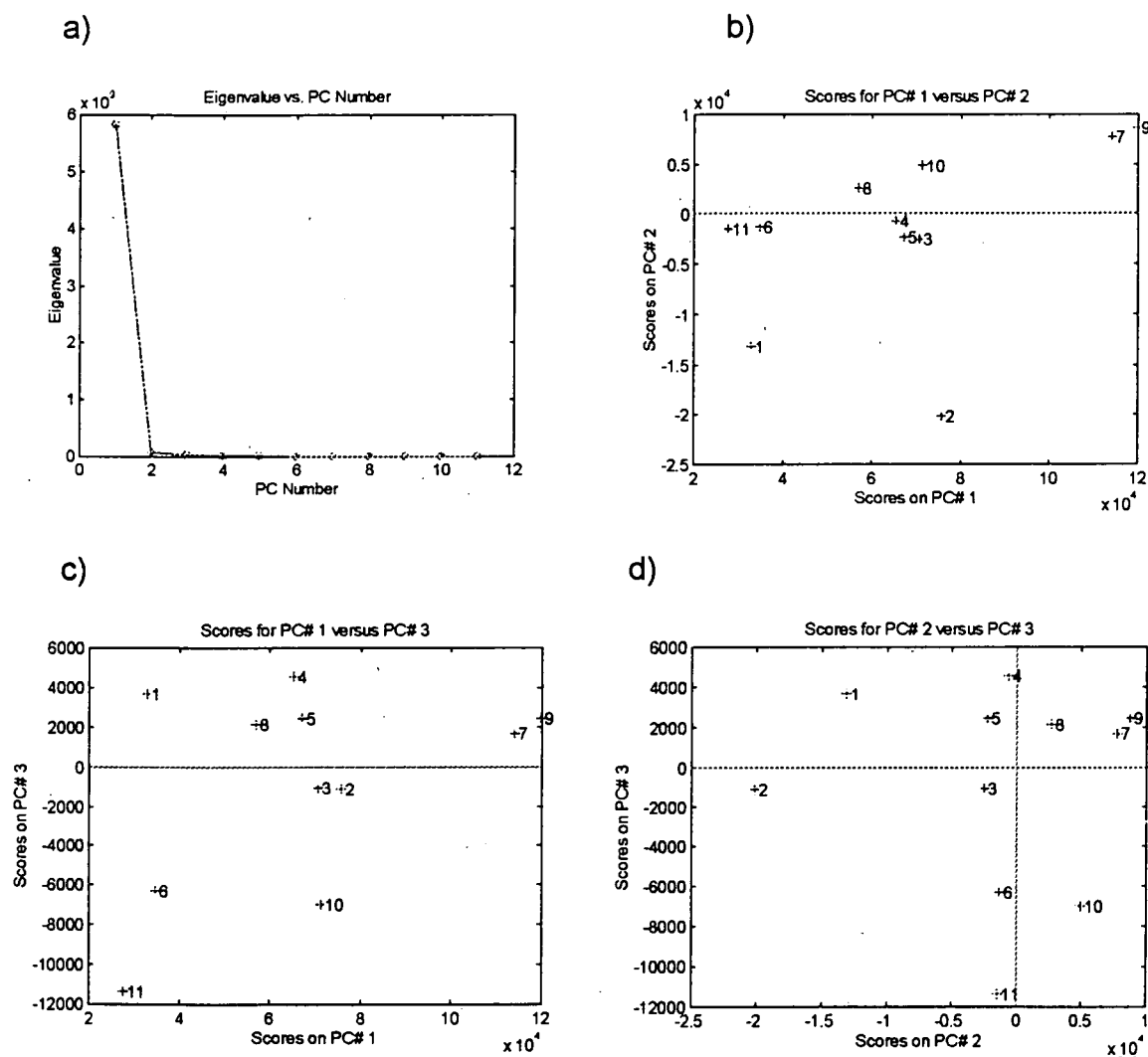


4.1.1.1.1 Planejamento Fatorial 2^3 - Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada a EPR

Ao se aplicar a PCA às análises de EPR em temperatura ambiente (TA) a Figura 20 (a) apresenta o número de componentes principais (CP) a serem escolhidas para a aplicação da PCA. Nesse caso, o autovalor obtido para a segunda CP é $1,89\text{e}+002$ e explica 99,53 % da variância total dos dados. A Figura 20 (b) mostra os “scores” da 1ª CP versus a 2ª CP e demonstra que a 2ª CP separa as amostras estudadas em função da temperatura; no quadrante negativo da 2ª CP encontram-se as amostras com temperatura de reação de 40°C e no quadrante positivo as amostras com temperatura de 60°C . O agrupamento das amostras 3, 4, e 5 sugere que o tempo e a concentração não influenciam no agrupamento das mesmas e sim a temperatura de 40°C . A Figura 20 (c) mostra os “scores” da 1ª CP versus a 3ª CP sendo que a 3ª CP separa as amostras em função do tempo de reação; no quadrante negativo da 3ª CP encontram-se as

amostras com tempo de reação de 6 horas e no quadrante positivo da 3ª CP encontram-se as amostras com tempo de reação de 12 horas. A Figura 20 (d) mostra os “scores” da 2ª CP versus a 3ª CP; a 2ª CP separa as amostras em função da temperatura de reação, de 40 °C no quadrante negativo e de 60 °C no quadrante positivo. Nestas Figuras 20 (a), (b) e (c) verifica-se a tendência de agrupamento das amostras 7 e 9 em função do tempo de reação de 6 horas e da temperatura de reação de 60 °C. Basicamente o mesmo comportamento é observado para as análises de EPR em baixa temperatura (77 K). Em função de se estar trabalhando com uma matriz bastante complexa se optou pelo cálculo de efeitos, interações e superfície de resposta para maiores elucidações sobre qual a melhor metodologia de nitrção do resíduo lodo biológico.

Figura 20: Planejamento 2³ - Análise de componentes principais (PCA) aplicada a EPR às amostras obtidas a partir dos ensaios do planejamento 2³

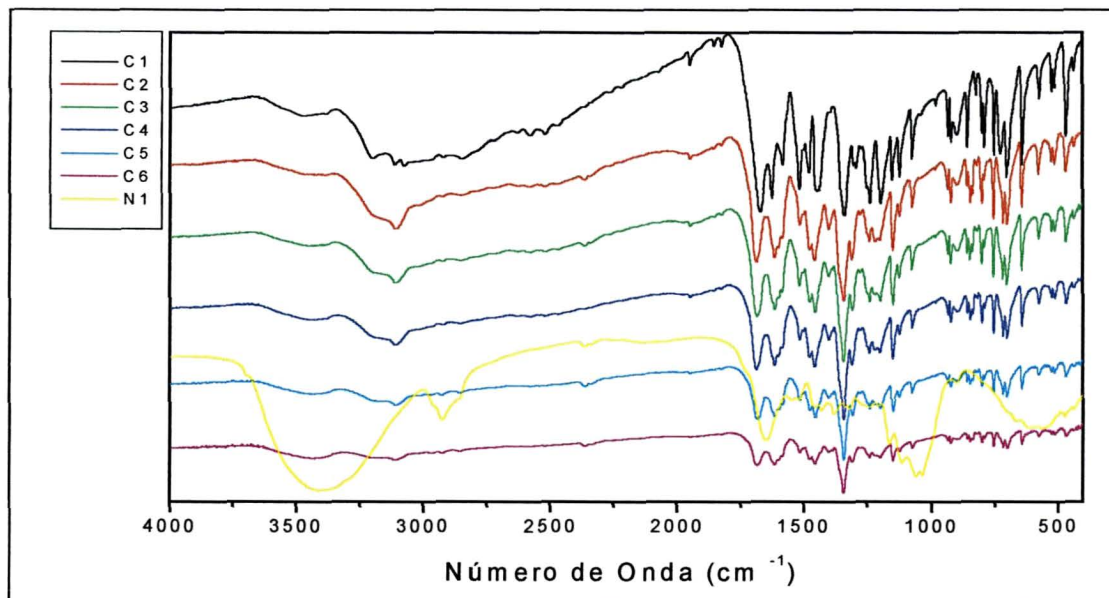


4.1.1.1.2 Planejamento Fatorial 2^3 - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T)

Inicialmente realizou-se uma calibração utilizando-se o padrão, ácido 5 nitrosalicílico (5NSA), para verificar se esse material poderia ser utilizado como modelo para as reações de nitração. Como o 5NSA apresenta um grupo NO_2 na posição 5 do anel benzênico (em posição para ao grupo OH do anel) se poderia verificar assim a formação de grupos NO_2 nesta posição nos espectros das amostras após o processo de nitração. Para esta calibração utilizou-se 5 mg do 5NSA diluído em 600 mg de KBr; dessa mistura (amostra 1) retirou-se 150 mg para se fazer a primeira diluição. Retiraram-se 100 mg da amostra 1 e adicionaram-se mais 50 mg de KBr obtendo-se assim a segunda diluição (amostra 2); retirou-se 75 mg da amostra 1 e adicionaram-se mais 75 mg de KBr obtendo-se assim a terceira diluição (amostra 3); retirou-se 50 mg da amostra 1 e adicionaram-se mais 100 mg de KBr obtendo-se assim a quarta diluição (amostra 4); retirou-se 25 mg da amostra 1 e adicionaram-se mais 125 mg de KBr obtendo-se assim a quinta diluição (amostra 5); retirou-se 12,5 mg da amostra 1 e adicionaram-se mais 137,5 mg de KBr obtendo-se assim a sexta diluição (amostra 6). Este processo foi repetido cinco vezes para maior confiabilidade dos dados e foram obtidos espectros para cada amostra.

Fez-se uma curva de calibração utilizando-se o espectro médio das seis repetições para cada diluição (concentração da amostra). O método de mínimos quadrados parciais (PLS) foi empregado para construir um modelo de calibração utilizando a região selecionada de $1540\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$. A Figura 21 mostra a média das seis repetições desta calibração e a amostra lodo biológico (N1).

Figura 21: Espectros por transmitância (T) da média das 6 repetições com o ácido 5NSA e a amostra pura do lodo biológico.



O 5-NSA não foi um bom modelo ao se comparar os processos de nitrificação, devido ao deslocamento das bandas de interesse na região de 1570-1500 cm⁻¹.

Nas Figuras 22 e 23 observam-se diferenças entre os espectros na região de $3000 \sim 2700 \text{ cm}^{-1}$ (C-H alifáticos), em $2300 \sim 1860 \text{ cm}^{-1}$ (banda de combinação de C-O de carboidratos), em $1860 \sim 1570 \text{ cm}^{-1}$ (COOH + COO⁻) e em $1570 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ (grupos nitro, NO₂).

Na Figura 23 verifica-se que o ombro em 1720 cm^{-1} (C=O de COOH) e banda em 1530 cm^{-1} (NO₂) são mais intensos na amostra nitrada que no lodo puro ou na amostra reduzida por SnCl₂.

Em uma tentativa de se distinguir as diferentes nitrações calculou-se a área de certas regiões de interesse no espectro, sendo essas:

número de onda de $3001 \sim 2750$: região de C-H alifáticos;

número de onda de $2300 \sim 1861$: região de C-O de carboidratos;

número de onda de $1861 \sim 1573$: região de COOH + COO⁻;

número de onda de $1581 \sim 1485$: região de grupos nitro NO₂;

Utilizou-se a região de $2300\text{-}1861 \text{ cm}^{-1}$ para avaliar carboidratos, uma vez que a banda mais intensa desses grupos (1050 cm^{-1}) é sobreposta pelos grupos Si-O de argilas. Anteriormente para o cálculo das áreas, se fez um pré-tratamento dos espectros utilizando o software Matlab. As regiões de interesse do espectro (já citadas) foram selecionadas, alisadas (minimização dos ruídos), normalizadas (minimização da variação do caminho ótico) e calculadas as suas absorbâncias utilizando-se a equação: $A = \log (1/T)$, sendo que os mesmos encontram-se na Figura 22 a seguir.

Figura 22: Espectros de FTIR em absorvância (A) das amostras do lodo biológico (N1) e nitrações

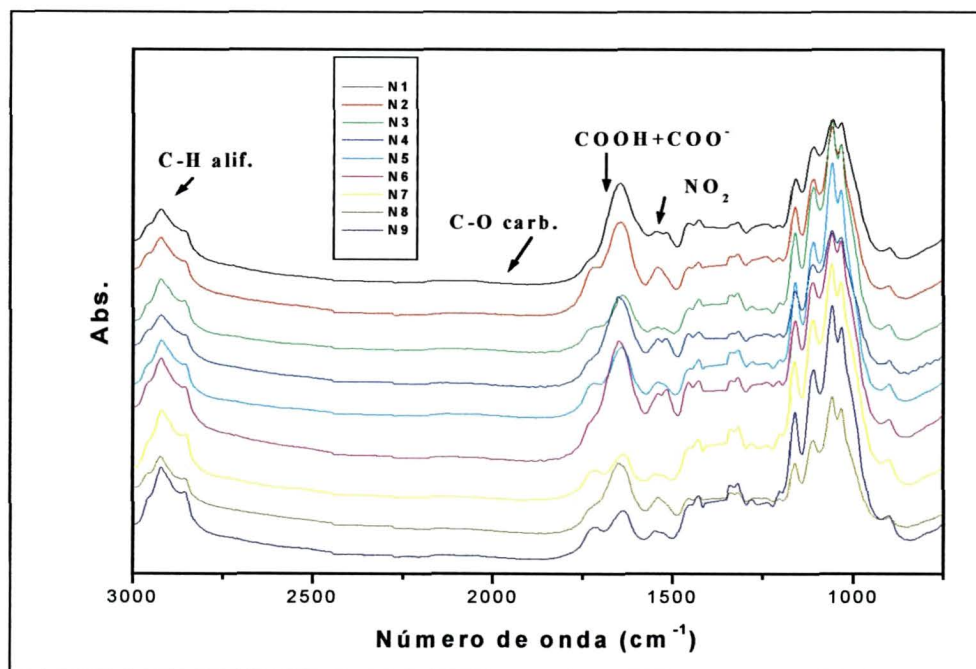
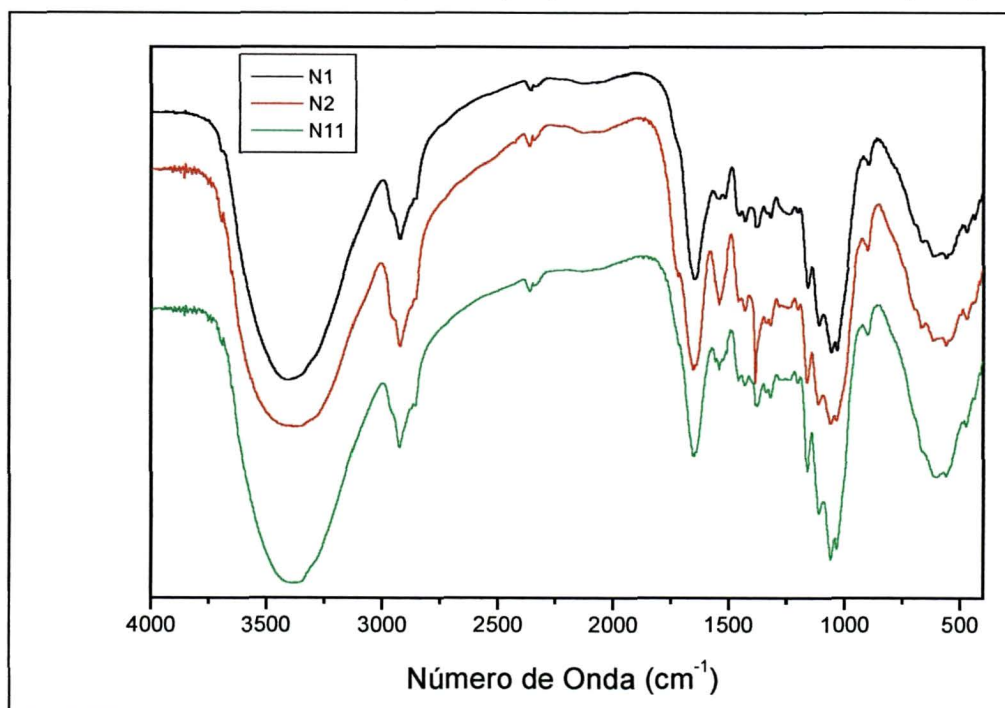


Figura 23: Espectros por transmitância (T) das amostras lodo biológico (N1), nitrada com 1 mol L⁻¹, 6 horas, 40°C (N2) e reduzida com SnCl₂ (N11)



Em algumas amostras, observa-se um pico em 1380 cm^{-1} que pode se referir a grupos nitro ou nitrato (Silverstein e colaboradores, 1979). Para se distinguir este pico a fração sólida das nitrações realizadas nos ensaios N2, N3 e N4 foram lavadas com aproximadamente 500 mL de HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ e verificou-se que este pico não persistiu nos espectros como pode ser verificado na Figura 23, sugerindo então, a existência de nitrato adsorvido nestas amostras. Este nitrato provavelmente deslocou-se para a fração solúvel (lavada com HCl).

As respectivas áreas são vistas na Tabela 13 e algumas correlações nas Figuras 24 e 25. Nas mesmas Figuras são dados os respectivos coeficientes de correlação lineares.

Tabela 13: Números de onda (cm^{-1}) de interesse para o cálculo das áreas das amostras estudadas

	3001-2750	2300-1861	1861-1573	1581-1485
	(cm^{-1})	(cm^{-1})	(cm^{-1})	(cm^{-1})
N1	1,0624	0,1371	1,6286	0,1205
N2	1,2766	0,1228	2,3194	0,3027
N3	1,4910	0,1745	1,3285	0,0712
N4	1,2417	0,1624	2,0979	0,2927
N5	1,4845	0,1729	1,7040	0,1751
N6	1,4686	0,1569	2,1856	0,3114
N7	1,8198	0,1486	1,1537	0,0738
N8	1,1287	0,1228	1,8460	0,2331
N9	1,6703	0,1770	1,3469	0,0793
N10	1,3584	0,1302	2,2893	0,2138
N11	1,1575	0,1272	1,8859	0,1555

Figura 24: Correlação entre as áreas de ϕ -NO₂ (1581-1485 cm⁻¹) e ϕ -COOH + COO⁻ (2300-1861 cm⁻¹)

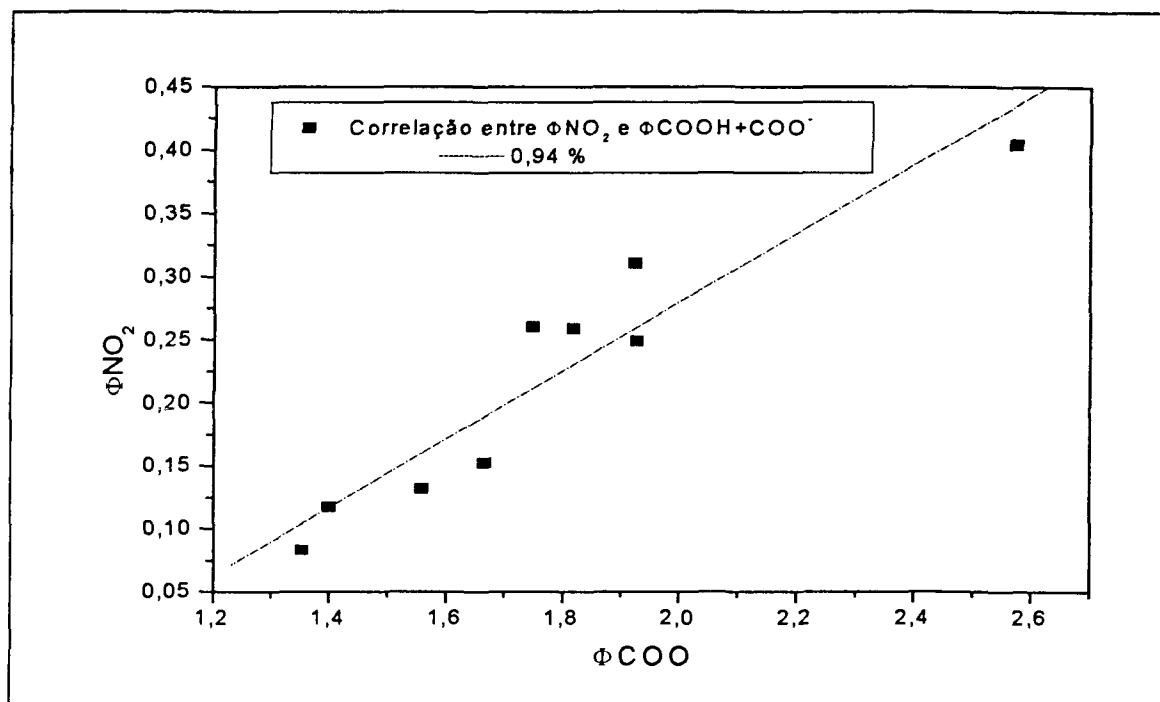
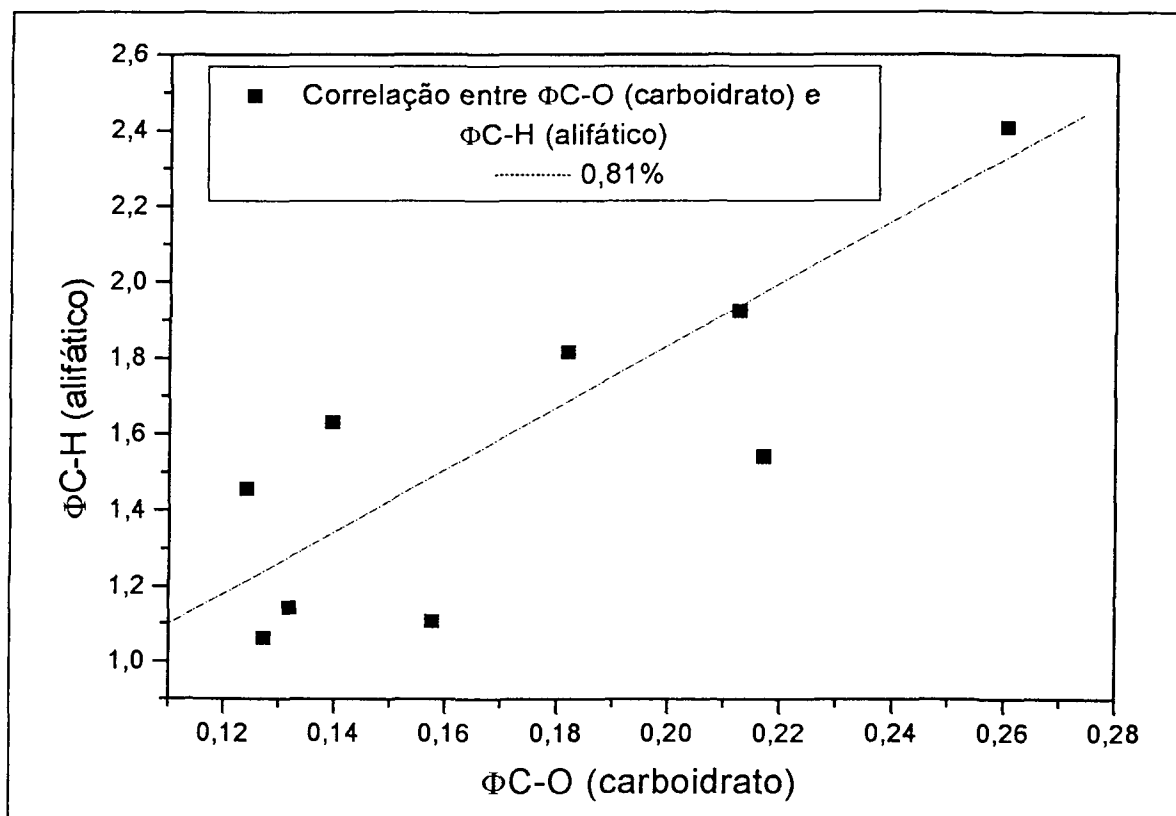


Figura 25: Correlação entre as áreas de ϕ C-O (carboidrato) (2300-1861 cm⁻¹) e ϕ C-H (alifático) (3001-2750 cm⁻¹)



Através da Figura 24 observa-se que existe uma boa correlação entre as absorções dos grupos ϕ NO₂ e as de ϕ COOH + COO⁻ mostrando que parte do ácido nítrico é gasto para nitrar e parte é gasta para oxidar. Pela Tabela 13 observa-se que a nitração com menor concentração de HNO₃, menor tempo e menor temperatura favoreceu o processo de nitração/oxidação na fração sólida (maior área). A correlação mostra que há formação de R-NO₂ e esses são produzidos pela nitração com o HNO₃ e paralelamente ocorre também redução do HNO₃ para a oxidação de grupos orgânicos a grupos COOH + COO⁻.

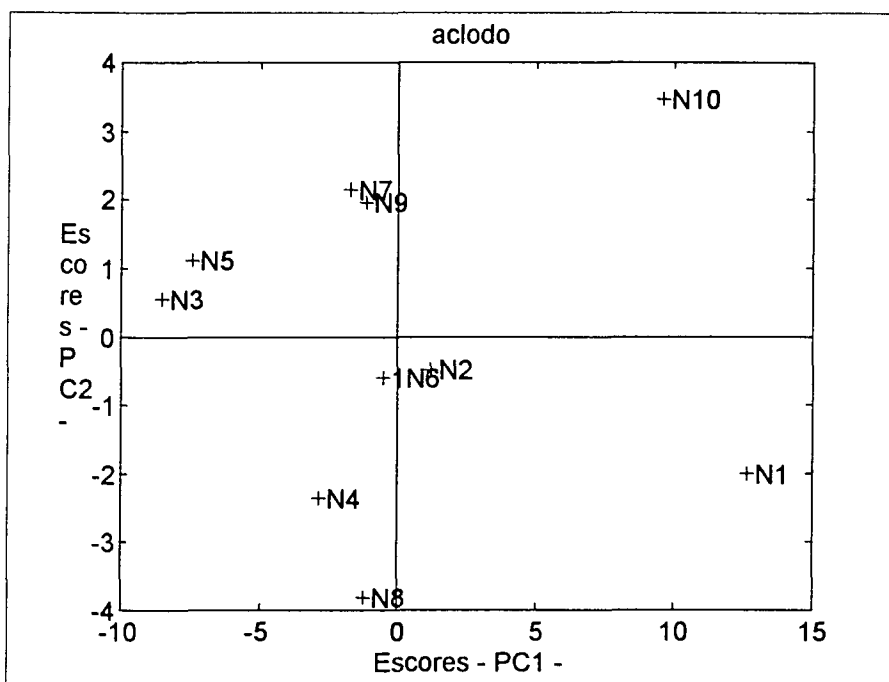
A correlação verificada na Figura 25 mostra a preservação da MO pois essas duas áreas representam MO. Observa-se um aumento na concentração de carboidratos e C-H alifáticos na fração sólida quando se utilizou maior concentração de HNO₃. O ácido nítrico (HNO₃) atacou mais outras estruturas orgânicas e inorgânicas do lodo biológico. Interpretamos que ao utilizar-se HNO₃ com concentração 6 mol L⁻¹ houve uma oxidação da fração orgânica sólida tornando-a solúvel. Nas próximas etapas analisaremos também as frações solúveis para confirmação destas suposições.

4.1.1.1.2.1 Planejamento Fatorial 2³ - Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada a FTIR por Absorbância

Aplicou-se a PCA (Figura 26) às amostras lodo biológico (N1) e as nitradas analisadas por FTIR utilizando os espectros em absorbância, alisados, normalizados e se retirando as regiões de H₂O, CO₂ e nitrato como já mencionado no texto referente à Figura 22.

Aplicou-se a PCA também aos espectros das regiões estudadas no planejamento 2³ para se verificar se há a mesma tendência de agrupamento ou separação das amostras.

Figura 26: “Scores” para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros em absorvância (A) das amostras estudadas

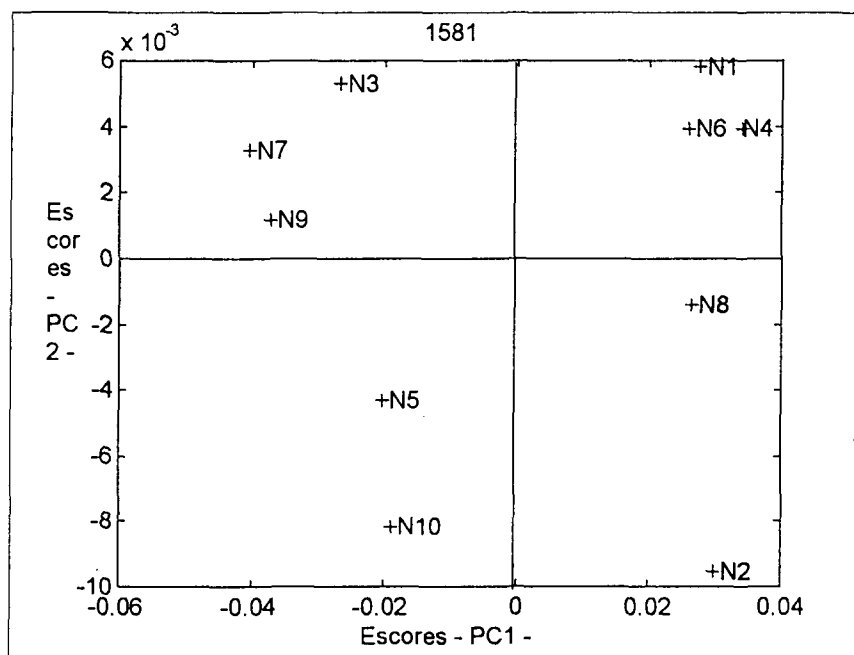


Observa-se na Figura 26 que a CP1 separou as amostras nitradas com 6 mol L⁻¹ da amostra do lodo puro, da nitração intermediária (N10) e das nitrações em concentrações mais baixas de HNO₃. Enquanto que a CP2 separou as amostras nitradas com HNO₃ 6 mol L⁻¹ e a nitração intermediária (N10) das amostras nitradas com HNO₃ 1 mol L⁻¹ e a amostra lodo biológico (N1). Observa-se no quadrante positivo da CP2 um agrupamento das amostras com concentração de 6 mol.L⁻¹ e em função da temperatura.

A CP1 representa 85 % da variância entre os dados das amostras enquanto que a CP2 representa 10 %. As CP3 com 3 % e CP4 com 1 % explicam uma pequena variância dos dados, mas que em alguns casos são significativas para mostrar diferenças sutis entre as amostras.

A Figura 27 mostra a PCA aplicada às amostras lodo biológico (N1) e as nitradas analisadas por FTIR (Figura 22) utilizando os espectros em absorvância, alisados, normalizados na região de 1581 a 1485 cm⁻¹ (grupos NO₂). As duas primeiras CP explicam 98,71% da variância total dos dados.

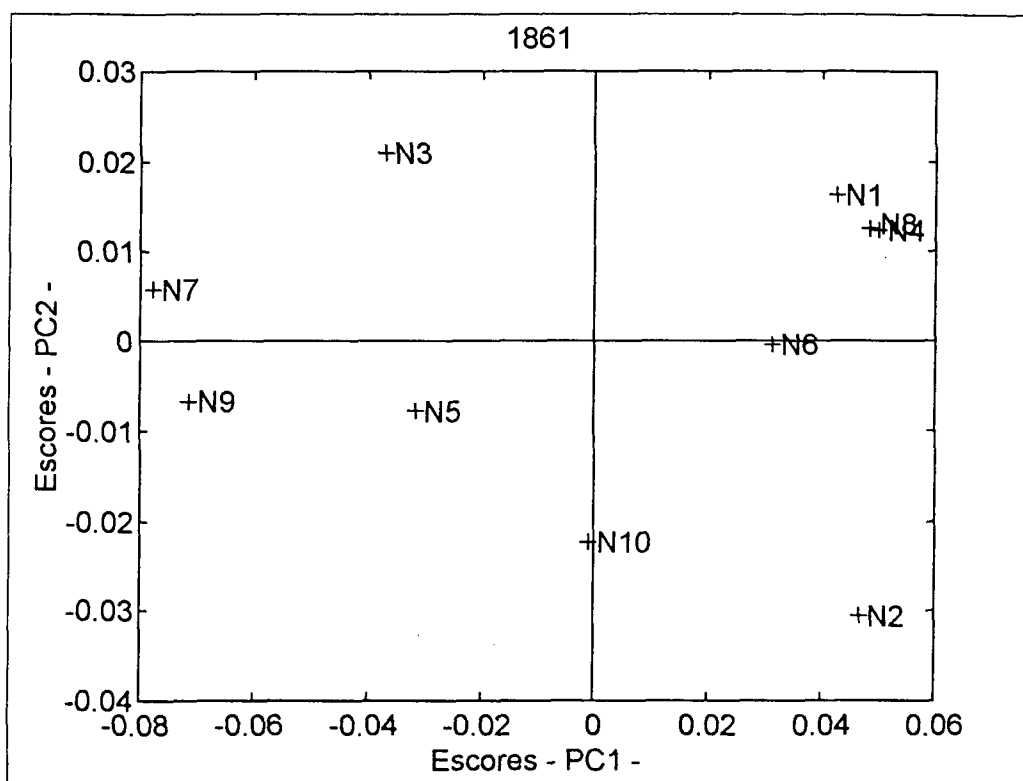
Figura 27: “Scores” para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros das amostras estudadas na região de 1581 a 1485 cm⁻¹ (grupos NO₂) em absorvância (A)



A CP1 (como a CP2 da Figura 26) separou as amostras nitradas com HNO₃ 6 mol L⁻¹ e a nitração intermediária (N10) das amostras nitradas com HNO₃ 1 mol L⁻¹ e a amostra lodo biológico (N1).

A Figura 28 mostra a PCA aplicada às amostras lodo biológico (N1) e as nitradas analisadas por FTIR (Figura 22) utilizando os espectros em absorvância, alisados, normalizados na região de 1861 a 1573 cm⁻¹ (COOH + COO⁻). A CP1 e CP2 representam 95,5 % da variância total entre as amostras. Novamente as nitrações com HNO₃ 6 mol L⁻¹ ocupam, quase que o mesmo quadrante negativo da CP1 e 1 mol L⁻¹ (quadrante positivo da CP1) (Figura 28).

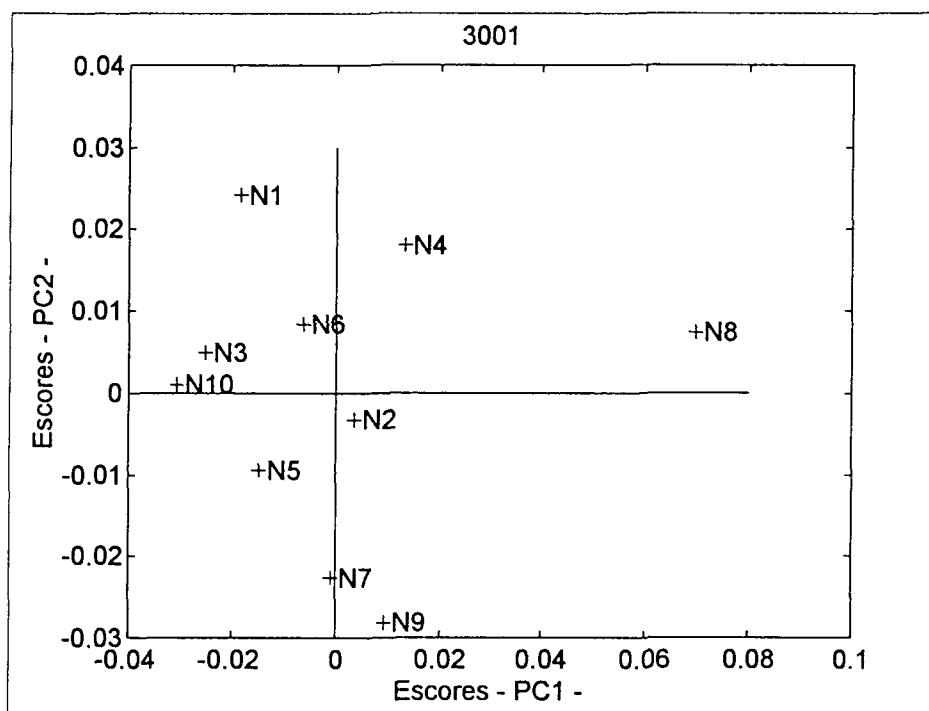
Figura 28: “Scores” para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros das amostras estudadas na região de 1861 a 1573 cm^{-1} (COOH + COO⁻) em absorvância (A)



A PCA aplicada às amostras lodo biológico (N1) e as nitradas analisadas por FTIR (Figura 22) utilizando os espectros em absorvância, alisados, normalizados na região de 2300 a 1861 cm^{-1} (C-O de carboidratos) não apresentou o mesmo comportamento observado para as regiões discutidas anteriormente. Provavelmente devido a baixa intensidade da banda nesta região.

A Figura 29 mostra a PCA aplicada às amostras lodo biológico (N1) e as nitradas analisadas por FTIR (Figura 22) utilizando os espectros em absorvância, alisados, normalizados na região de 3001 a 2750 cm^{-1} (C-H alifáticos). As duas primeiras CP explicam ~ 98 % da variância total dos dados. A novidade aqui é que a CP2 tem razoável peso, 25 %.

Figura 29: “Scores” para a 1ª componente principal (CP1) versus a 2ª componente principal (CP2) dos espectros das amostras estudadas na região de 3001 a 2750 cm⁻¹ (C-H alifáticos) em absorvância (A)



A Figura 29 mostra a separação da amostra nitrada com HNO₃ 1 mol L⁻¹, 12 horas e 60 ° C para um lado e as demais agrupadas do outro lado da CP1. Através da PCA, em todas as regiões estudadas, com exceção da região de carboidratos, distingui-se as amostras nitradas com 6 mol L⁻¹ das nitradas com 1 mol L⁻¹ e da amostra lodo puro.

4.1.1.1.2.2 Planejamento Fatorial 2³ - Cálculo dos Efeitos e Interações

Os espectros em absorvância (A) (Figura 22) foram pré-tratados para então serem realizados os cálculos dos efeitos. Estes pré-tratamentos constaram de:

- 1) retirada das regiões referentes a O-H de água (~ 4000–3000 cm⁻¹), CO₂ (~ 2400–2280 cm⁻¹) e nitrato (~ 1410–1350 cm⁻¹);
- 2) alisamento em 13 pontos para se diminuição da influência de ruídos, segundo o algoritmo Savitzky-Golay;

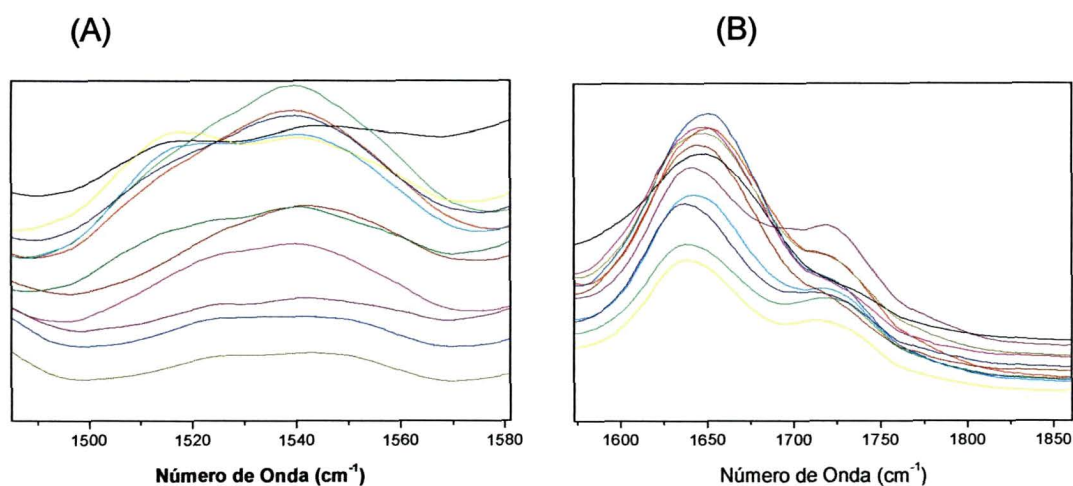
3) após a retirada das regiões de interferência (O-H de H₂O, CO₂ e nitrato) e alisamento, os espectros foram normalizados dividindo cada intensidade por uma constante (soma das intensidades);

4) após, calculou-se então as áreas de maior interesse das seguintes regiões:

- a) número de onda de 3001 ~ 2750: região de C-H alifáticos;
- b) número de onda de 2300 ~ 1861: região de C-O de carboidratos;
- c) número de onda de 1861 ~ 1573: região de COOH + COO⁻;
- d) número de onda de 1581 ~ 1485: região de grupos nitro (NO₂).

A Figura 30 (A) mostra os espectros de FTIR na região de 1581–1485 cm⁻¹ (Grupos NO₂) e a Figura 30 (B) mostra os espectros de FTIR na região de 1861-1573 cm⁻¹ (COOH+COO⁻) das amostras do planejamento fatorial 2³ utilizadas para o cálculo das áreas.

Figura 30: Região de 1581 – 1485 cm⁻¹ (Grupos NO₂) (A) e região de 1861-1573 cm⁻¹ (COOH+COO⁻) (B) dos espectros em absorbância (A) de FTIR das amostras do planejamento fatorial 2³ utilizadas para o cálculo das áreas



As áreas calculadas a partir dos espectros de FTIR são mostradas na Tabela 14.

Os ensaios N6, N7, N8 e N9 correspondem ao nível (+) de temperatura (60°C) enquanto que os ensaios N2, N3, N4 e N5 correspondem ao nível (-) de temperatura (40°C).

Os ensaios N4, N5, N8 e N9 correspondem ao nível (+) de tempo (12 horas) enquanto que os ensaios N2, N3, N6 e N7 correspondem ao nível (-) de tempo (6 horas).

Os ensaios N3, N5, N7 e N9 correspondem ao nível (+) de concentração de HNO_3 (6 mol L⁻¹) enquanto que os ensaios N2, N4, N6 e N8 correspondem ao nível (-) de concentração de HNO_3 (1 mol L⁻¹).

As respostas correspondentes aos ensaios são as áreas das regiões de 1861 a 1573 cm⁻¹ e de 1581 a 1485 cm⁻¹, que são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados do planejamento fatorial 2³ a partir das áreas calculadas para as regiões de NO₂ (1581-1485 cm⁻¹) e COOH+COO⁻ (1861-1573 cm⁻¹) dos espectros de FTIR

Ensaio	1	2	3	Área	
				NO ₂	COOH+COO ⁻
N1	Lodo biológico				
N2	-	-	-	0,3027	2,3194
N3	+	-	-	0,0712	1,3285
N4	-	+	-	0,2927	2,0979
N5	+	+	-	0,1751	1,7040
N6	-	-	+	0,3114	2,1856
N7	+	-	+	0,0738	1,1537
N8	-	+	+	0,2331	1,8459
N9	+	+	+	0,0793	1,3439

O cálculo dos efeitos e interações utilizando as áreas nas regiões do Infravermelho, como resposta das nitrações pode ser visto na tabela 15 a seguir.

O efeito da temperatura, calculado utilizando-se como resposta à área da região de 1861 a 1573 cm⁻¹ e a área da região de 1581 a 1485 cm⁻¹, foi -0,2294 e -0,0360, respectivamente. Este valor indica que a área de 1861 a 1573 cm⁻¹ diminui

de 0,2294 e a área da região de 1581 a 1485 cm^{-1} diminui de 0,0360 quando a temperatura passa de seu nível inferior (40 $^{\circ}\text{C}$) para o superior (60 $^{\circ}\text{C}$) indicando que o efeito da temperatura é mais pronunciado na oxidação (variação na área da região de 1861 e de 1573 cm^{-1}).

Para o efeito do tempo o valor para a região de 1861 a 1573 cm^{-1} foi +0,0019 e para a área da região de 1581 a 1485 cm^{-1} foi +0,0052. Desta forma, a mudança do tempo de 6 horas para 12 horas não afeta significativamente o processo de nitratação/oxidação.

O efeito da concentração do HNO_3 calculado através das mesmas áreas foi -0,7289 e -0,1851, respectivamente indicando que estas áreas aumentam significativamente quando a concentração de HNO_3 diminui de 6 mol L^{-1} para 1 mol L^{-1} .

Tabela 15: Cálculo dos Efeitos e Interações utilizando as áreas nas regiões de FTIR, como resposta das nitrações

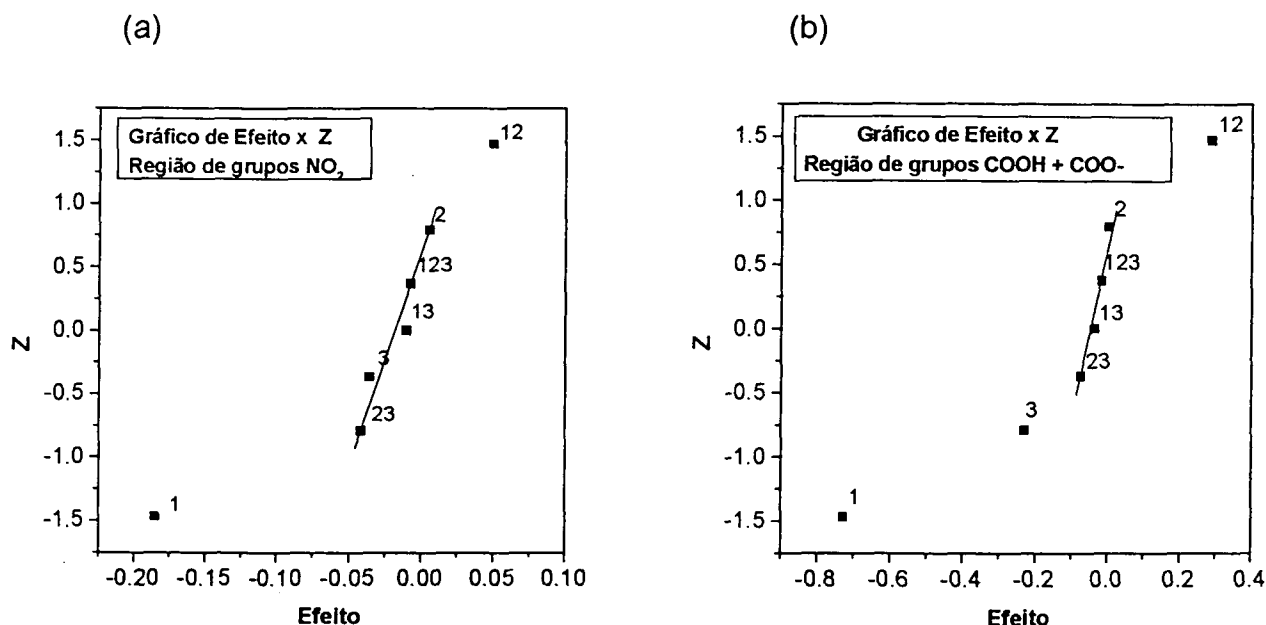
Efeitos	3001-2750 (cm^{-1})	2300-1861 (cm^{-1})	1861-1573 (cm^{-1})	1581-1485 (cm^{-1})
1	+0,3375	+0,0270	-0,7289	-0,1851
2	-0,1327	+0,0081	+0,0019	+0,0053
3	-0,1484	-0,0068	-0,2294	-0,0360
12	+0,0547	+0,0053	+0,2824	+0,0494
13	+0,1089	-0,0041	-0,0365	-0,0106
23	-0,1120	-0,0109	-0,0751	-0,0417
123	-0,0376	+0,0259	-0,0160	-0,0075

Os efeitos da temperatura, concentração de HNO_3 e tempo de reação foram calculados através da equação que utiliza a média dos coeficientes de contraste conforme item 1.3.3:

$$(\text{EP}) = \delta_+ - \delta_-$$

Estes efeitos e interações podem ser melhor visualizados na Figura 31 a seguir através dos gráficos de efeito “versus” probabilidade cumulativa.

Figura 31: Gráficos de efeito versus probabilidade cumulativa para as regiões de grupos nitro (a), carboxílicos e carboxilatos (b)



A partir da análise por gráficos normais se verificou que para a região de grupos nitro os únicos efeitos significativos são o efeito da concentração de HNO_3 e a interação (concentração x tempo). Já para a região de grupos carboxílicos e carboxilatos os efeitos significativos são a concentração de HNO_3 , a interação (concentração x tempo) e a temperatura, sendo o último menos acentuado.

4.1.1.1.2.3 Planejamento Fatorial 2^3 - Superfície de Resposta

Os gráficos de superfícies de resposta foram obtidos a partir de matrizes de dados que continham os níveis estudados de concentração e tempo (-1, 0 e 1) e as respostas foram obtidas a partir das áreas dos espectros de infravermelho. As superfícies de resposta foram feitas com os ensaios realizados a temperatura de 40 °C. A matriz de dados para a região de grupos nitro e para a região de grupos carboxílicos e carboxilatos se encontra a seguir nas Tabelas 16 e 17 respectivamente.

Tabela 16: Matriz de dados da região de grupos nitro para os gráficos de superfície de resposta, planejamento fatorial

Concentração	Tempo de reação	Resposta
-1	-1	0,3027
1	-1	0,0712
0	0	0,2138
-1	1	0,2927
1	1	0,1751

Tabela 17: Matriz de dados da região de grupos carboxílicos e carboxilatos para os gráficos de superfície de resposta, planejamento fatorial

Concentração	Tempo de reação	Resposta
-1	-1	2,3194
1	-1	1,3285
0	0	2,2893
-1	1	2,0979
1	1	1,7040

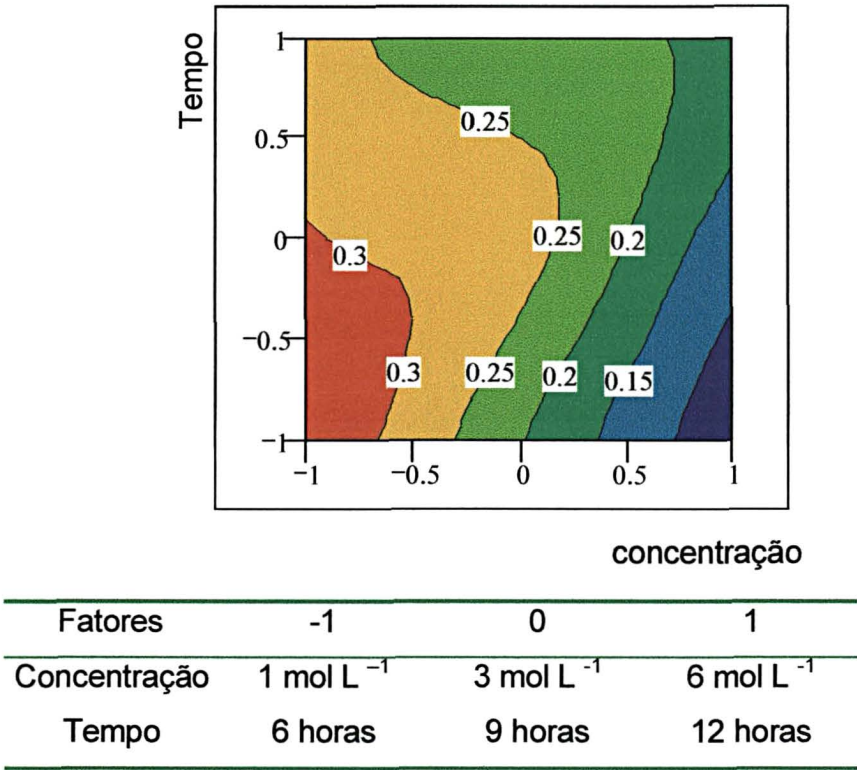
Os números expressos nos eixos da superfície de resposta são referentes aos níveis estudados no planejamento fatorial. No eixo das abscissas se tem a concentração de HNO_3 e no eixo das ordenadas se tem o tempo de reação.

A concentração de HNO_3 varia de 1 a 6 mol L^{-1} . Os números expressos na abscissa -1, -0,5, 0, 0,5, 1, equivalem a concentrações de 1; 1,75; 3,5; 4,25 e 6 mol L^{-1} respectivamente. Já o tempo de reação varia de 6 a 12 horas. Os números expressos na ordenada -1; -0,5; 0; 0,5 e 1 equivalem a tempos de reação de 6; 7,5; 9; 10,5 e 12 horas, respectivamente.

Através da superfície de resposta para grupos nitro, se pode verificar que a região de maior rendimento (em vermelho), está na região de baixa concentração (1mol L^{-1}) (-1) e na região de tempo de reação entre 6 e 9 horas (-1 e 0). Para a região de grupos carboxílicos e carboxilatos, se tem a região central como de maior resposta, entre -0,5 e 0,5 nos dois eixos, concentração entre 2 e 4 mol L^{-1} e tempos de reação entre 8 e 10 horas. Como a diferença entre as respostas para grupos carboxílicos e carboxilatos é baixa entre 6 e 9 horas, se optou por escolher como ponto ótimo o ensaio com concentração de HNO_3 de 1mol L^{-1} e tempo de reação de 6 horas, em temperatura de 40 °C. Desta forma se tem o máximo de nitração e um razoável ponto de oxidação (Figura 32 e 33).

Figura 32: Superfícies de respostas de otimização do processo de nitração/oxidação - planejamento fatorial 2³ para a região de absorção de NO₂ em 2 dimensões (A) e em 3 dimensões (B)

(A)



B)

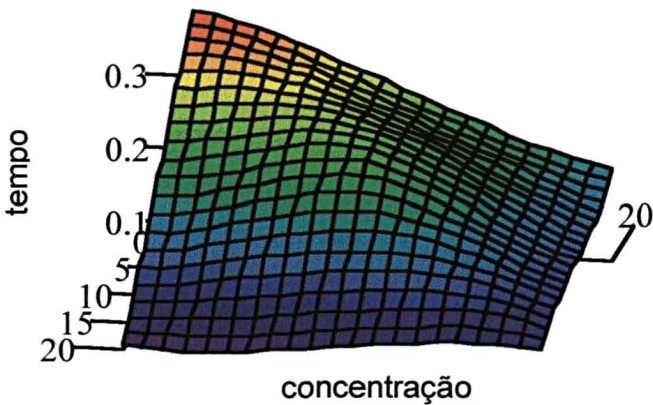
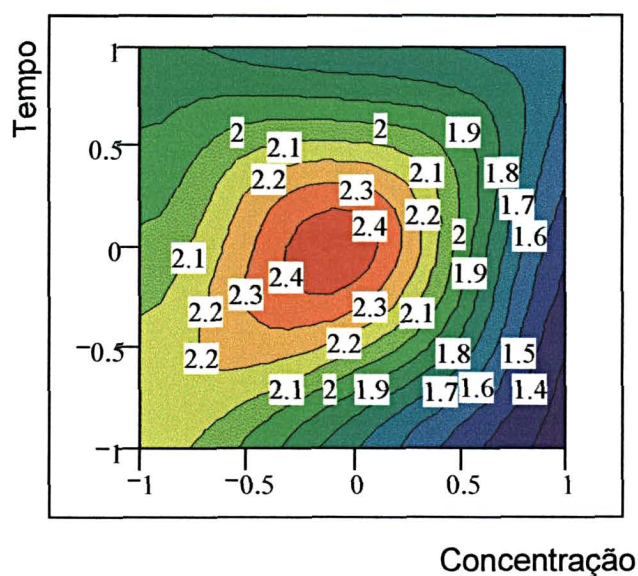


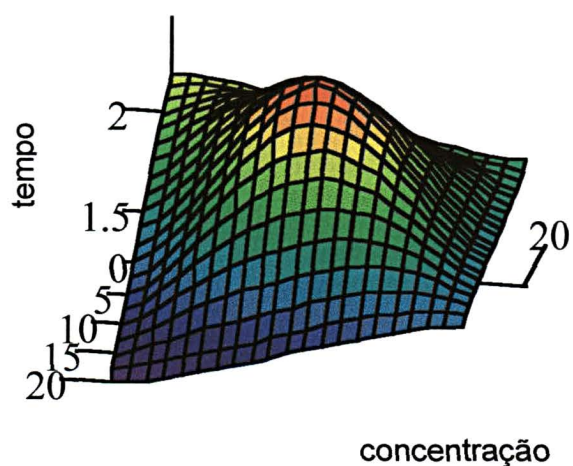
Figura 33: Superfícies de respostas de otimização do processo de nitração/oxidação - planejamento fatorial 2^3 para a região de absorção de $\text{COOH} + \text{COO}^-$ em 2 dimensões (A) e em 3 dimensões (B)

(A)



Fatores	-1	0	1
Concentração	1 mol L ⁻¹	3 mol L ⁻¹	6 mol L ⁻¹
Tempo	6 horas	9 horas	12 horas

(B)



4.1.1.1.3 Planejamento Fatorial 2³ - C, H, N, S

A Tabela 18 a seguir mostra os dados de C, H, N, S para as amostras do planejamento fatorial 2³.

Tabela 18: Análise elementar (C, H, N, S e O) em % e razões atômicas para as amostras lodo biológico (N1), as nitrações (N2 a N10) e a redução com SnCl₂ (N11) do planejamento fatorial 2³

Ensaio	% C*	% H*	% N*	% S*	% O**	H/C [#]	N/C [#]	O/C [#]
N1	42.2484	5.8933	3.4869	7.84	40.5314	1.6739	0.0707	0.7195
N2	44.6531	5.9383	4.0235	6.0934	39.2917	0.2687	0.0772	0.6599
N3	43.5211	6.1621	1.981	9.3532	38.9826	1.6991	0.0390	0.6718
N4	46.1813	6.2055	3.8201	7.6774	36.1157	1.6125	0.0709	0.5865
N5	44.6305	6.0644	2.481	7.6778	39.1463	1.6306	0.0476	0.6578
N6	46.2267	6.1802	3.2049	6.6515	37.7367	1.6043	0.0594	0.6122
N7	44.4082	6.1515	1.5056	5.6684	42.2663	1.6623	0.0290	0.7138
N8	46.1658	6.4202	1.6905	6.1548	39.5687	1.6688	0.0314	0.6428
N9	43.7464	5.7061	3.4891	6.1624	40.8961	1.5652	0.0684	0.7011
N10	43.7011	5.905	3.14	5.8478	41.4061	1.6215	0.0616	0.7106
N11	34.0691	4.8165	2.58	7.3021	51.2323	1.6965	0.0649	1.1278

*Porcentagem em massa; **Obtido pela diferença: 100 – (%C + % H + % N + % S); [#] Razões atômicas.

Observa-se que a % de Nitrogênio é maior para a amostra N2, que é o produto do processo de nitração mais brando.

4.1.1.2 Planejamento em Estrela para Nitração

A Tabela 19 a seguir mostra a matriz de planejamento dos ensaios baseados no planejamento estrela como citado no item 3.1.3.4.

Tabela 19: Matriz de planejamento dos ensaios baseados no planejamento estrela

Ensaio	Concentração de HNO ₃ (mol L ⁻¹)	Tempo (horas)	Temperatura (° C)
PE1		Lodo biológico	
PE2	0,6	3,17	40
PE3	1,4	3,17	40
PE4	0,6	8,83	40
PE5	1,4	8,83	40
PE6	1	6	40
PE7	0,43	6	40
PE8	1	10	40
PE9	1,56	6	40
PE10	1	2	40

(Barros Neto e colaboradores, 2001)

4.1.1.2.1 Planejamento em Estrela - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A Tabela 20 a seguir mostra as respostas do planejamento estrela empregando a concentração de radicais livres orgânicos (RLO) verificados através da técnica de EPR para as amostras estudadas no planejamento estrela apresentadas na Tabela 19. A aquisição dos dados de RLO segue a metodologia descrita no item 3.3.1.

Tabela 20: Concentração de radicais livres orgânicos (RLO) observados por EPR nas amostras estudadas do planejamento em estrela

Ensaio	Concentração	Tempo	Amostras	RLO (spins g ⁻¹)
PE1	—	—	Lodo biol.	1,8251e18
PE2	-1	-1	0,6M – 3,17h	1,4418e18
PE3	1	-1	1,4M – 3,17h	1,8306e18
PE4	-1	1	0,6M - 8,83h	1,7078e18
PE5	1	1	1,4M – 8,83h	1,2492e18
PE6	0	0	1,0M – 6,00h	1,2903e18
PE7	- 2 ^{1/2}	0	0,43M – 6,00h	1,6343e18
PE8	0	2 ^{1/2}	1,0M – 10,0h	1,4144e18
PE9	2 ^{1/2}	0	1,56M – 6,00h	1,4395e18
PE10	0	- 2 ^{1/2}	1,0M – 2,00h	1,6581e18
SP	-	-	Strong Pitch	4,473e15

Verifica-se que os valores de RLO segundo a Tabela 20 não variaram como nas amostras do planejamento fatorial 2^3 sugerindo novamente que a temperatura de reação de 40 °C é importante na manutenção de moléculas menores que se mantiveram na fração sólida.

Como já verificado para as amostras nitradas (4.1.1.1.1) na Figura 34 se observa que todos os espectros, obtidos na faixa de campo de 0 a 5000 G, apresentaram uma linha larga de absorção, na região de $g \sim 2,0$, atribuída a sais de Fe^{3+} e óxidos de Fe^{3+} em domínios concentrados. As amostras apresentaram ressonância em $g = 4,3$, indicando a presença de íons Fe^{3+} em domínios diluídos (Schreiner e colaboradores, 2001).

Nos espectros da Figura 35 se verifica uma linha de absorção de radical livre orgânico (RLO) em $g \sim 2,0$, que pode ser melhor observada nos espectros a 50 G em temperatura ambiente (TA) (Figura 35).

A amostra pura (PE00) apresentou sinais referentes a complexos de Mn^{2+} em estruturas de esfera externa (Figura 34).

A amostra pura (PE00) apresentou parâmetros de EPR correspondente a complexos de Fe^{3+} porfirina, com $g \sim 6,0$ (GOODMAN e HALL, 1994) e $g \sim 5,0$ correspondente a presença de íons Fe^{3+} em domínios diluídos (Schreiner e colaboradores, 2001) (Figura 34).

Figura 34: Espectros de EPR das amostras estudadas a 5000 G a temperatura ambiente do planejamento em estrela

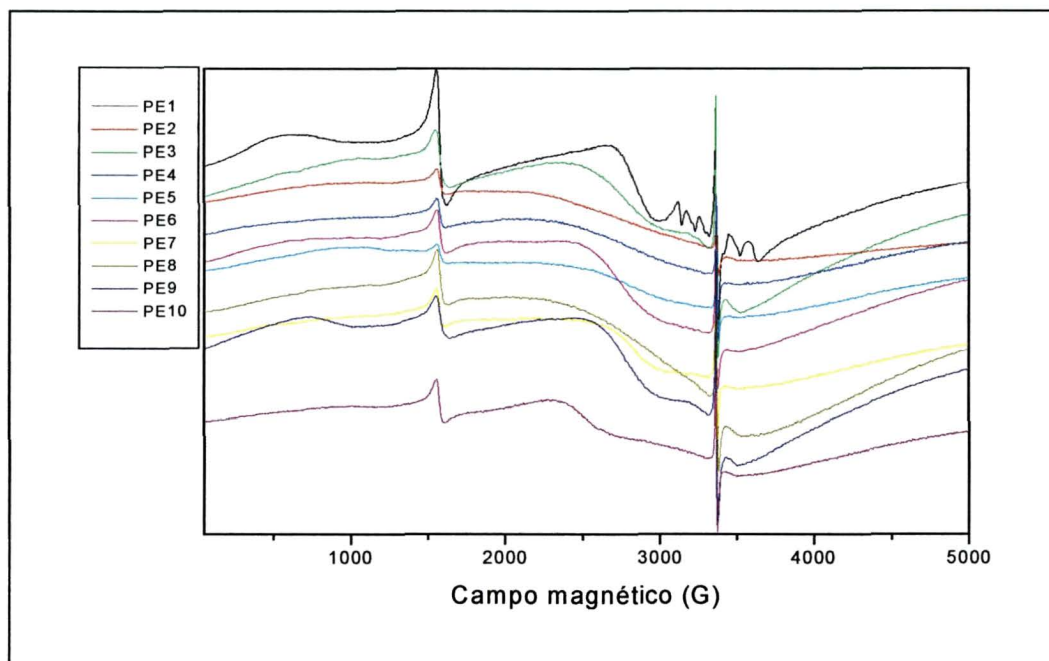
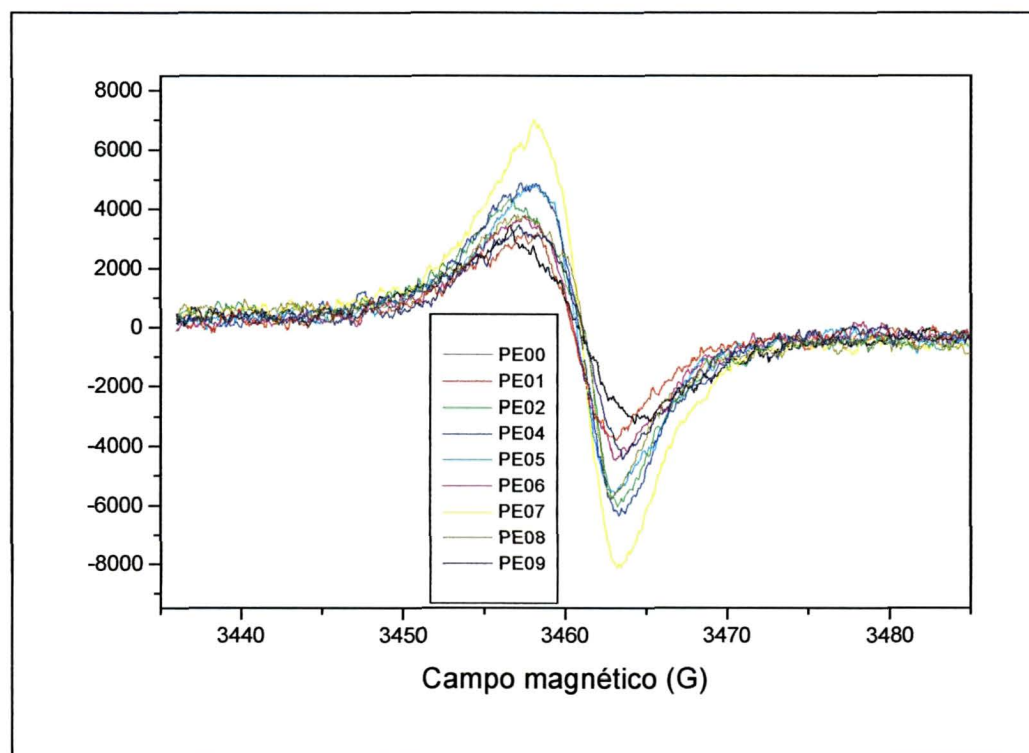


Figura 35: Espectros de EPR das amostras estudadas a 50 G a temperatura ambiente do planejamento em estrela



4.1.1.2.2 Planejamento Estrela - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância (T)

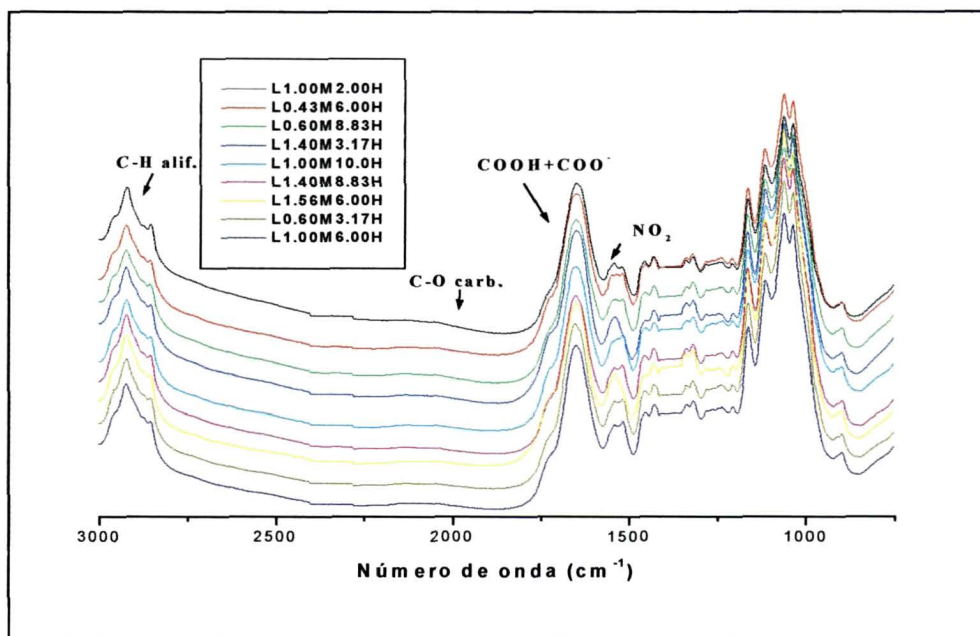
A Tabela 21 a seguir mostra os resultados do planejamento estrela empregando as áreas calculadas para as regiões de 1581 a 1485 cm^{-1} (NO_2) e de 1861 a 1573 cm^{-1} ($\text{COOH}+\text{COO}^-$) a partir dos espectros de FTIR.

Tabela 21: Resultados do planejamento estrela para as áreas calculadas a partir dos espectros de FTIR

Ensaio	Concentração	Tempo	Amostra	Área	
				(NO_2)	($\text{COOH}+\text{COO}^-$)
PE1	-1	-1	0,60M3,17H	0,2208	1,5672
PE2	1	-1	1,40M3,17H	0,2193	1,7992
PE3	-1	1	0,60M8,83H	0,2038	1,5305
PE4	1	1	1,40M8,83H	0,2247	1,5104
PE5	0	0	1,00M6,00H	0,2119	1,5598
PE6	$-2^{1/2}$	0	0,43M6,00H	0,2019	1,6068
PE7	0	$2^{1/2}$	1,00M10,0H	0,2372	1,5889
PE8	$2^{1/2}$	0	1,56M6,00H	0,2377	1,6417
PE9	0	$-2^{1/2}$	1,00M2,00H	0,1643	1,4389

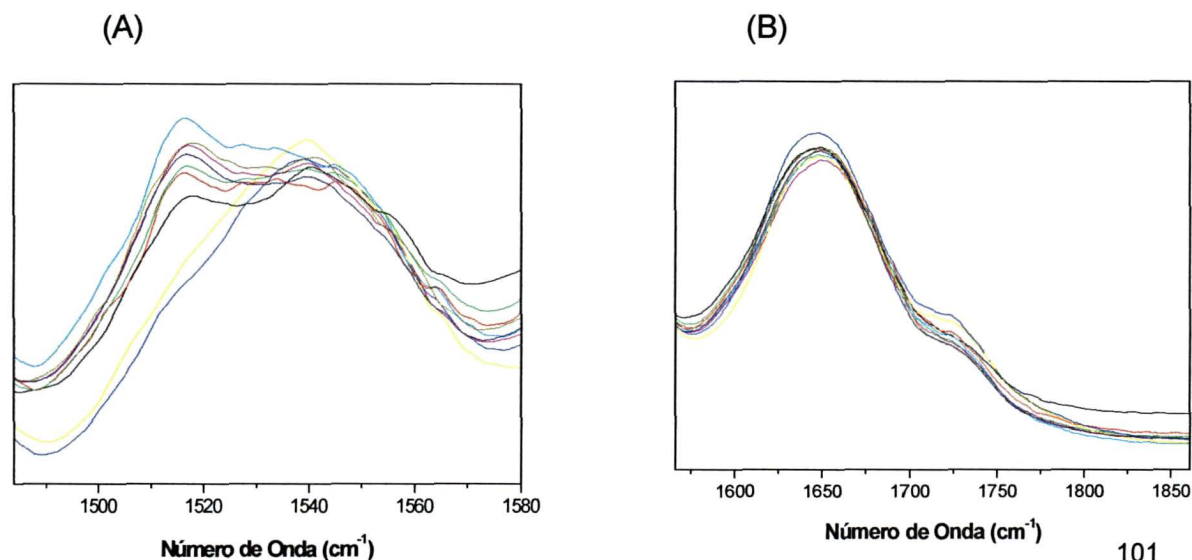
A Figura 36 mostra os espectros médios de FTIR (obtidos em triplicata) em absorbância (A), alisados, normalizados e se retirando as regiões de H_2O , CO_2 e nitrato das amostras para os 9 ensaios do planejamento em estrela.

Figura 36: Espectros de FTIR em absorvância (A) das amostras dos planejamentos em estrela obtidos em triplicata



A Figura 37 (A) mostra a região de $1581 - 1485 \text{ cm}^{-1}$ (Grupos NO_2) e a Figura 37 (B) mostra a região de $1861-1573 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{COOH}+\text{COO}^-$) dos espectros de FTIR em absorvância (A) para as amostras do planejamento em estrela utilizadas para o cálculo das áreas.

Figura 37: Região de $1581 - 1485 \text{ cm}^{-1}$ (Grupos NO_2) (A) e região de $1861-1573 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{COOH}+\text{COO}^-$) (B) dos espectros de FTIR em absorvância (A) das amostras do planejamento em estrela utilizadas para o cálculo das áreas



4.1.1.2.2.1 Planejamento em Estrela - Superfície de Resposta

Os resultados obtidos a partir da matriz de dados para a região de grupos nitro e para a região de grupos carboxílicos e carboxilatos encontram-se a seguir nas Tabelas 22 e 23, respectivamente.

Tabela 22: Matriz de dados da região de grupos nitro para os gráficos de superfície de resposta, planejamento em estrela

Concentração	Tempo de Reação	Resposta
-1	-1	0,2208
1	-1	0,2193
-1	1	0,2038
1	1	0,2247
0	0	0,2119
-1.414	0	0,2019
0	1.414	0,2372
1.414	0	0,2377
0	-1.414	0,1643

Tabela 23: Matriz de dados da região de grupos carboxílicos e carboxilatos para os gráficos de superfície de resposta, planejamento em estrela

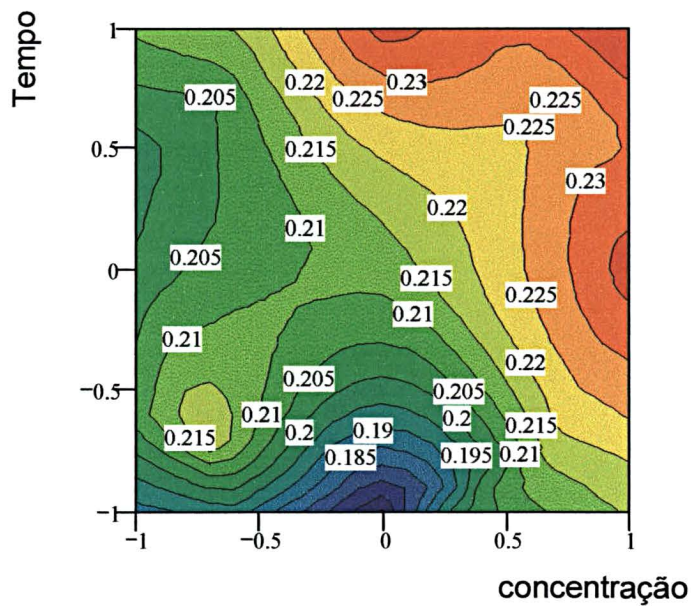
Concentração	Tempo de Reação	Resposta
-1	-1	1,5672
1	-1	1,7992
-1	1	1,5305
1	1	1,5104
0	0	1,5598
-1.414	0	1,6068
0	1.414	1,5889
1.414	0	1,6417
0	-1.414	1,4389

Através desta superfície, verificou-se que para grupos nitro têm-se duas regiões de maior resposta. Uma das regiões se encontra em concentração de 1,5 mol.L⁻¹ (1) e tempos entre 6 e 10 horas (0 e 1); e outra região se encontra em concentração média (1,0 mol L⁻¹) (0) e tempo de 10 horas (1).

Já para os grupos carboxílicos e carboxilatos, a maior resposta se encontra na região de maior concentração, entre 1,25 e 1,50 mol L⁻¹ (0,5 e 1) e tempos de reação baixos, entre 2 e 6 horas (-1 e 0). (Figuras 38 e 39).

Figura 38: Superfície de resposta de otimização do processo de nitratação/oxidação - planejamento em estrela para a região de absorção de NO₂ em 2 dimensões (A) e em 3 dimensões (B)

(A)



Fatores	-1	0	1
Concentração	0,43 mol L ⁻¹	1,00 mol L ⁻¹	1,56 mol L ⁻¹
Tempo	2 horas	6 horas	10 horas

(B)

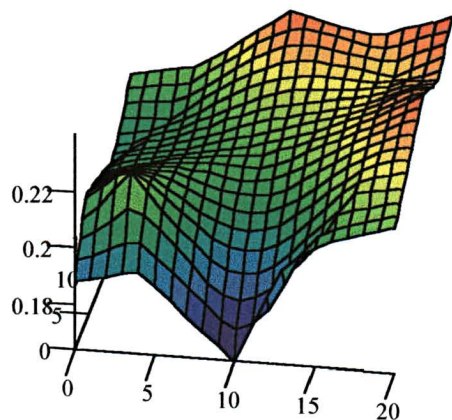
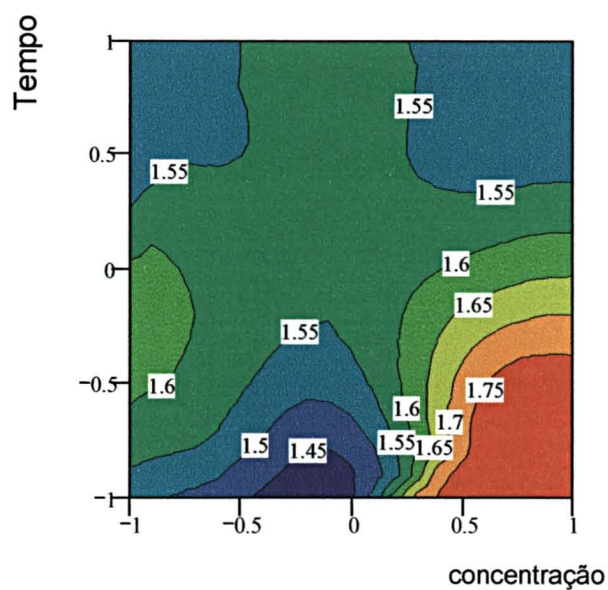


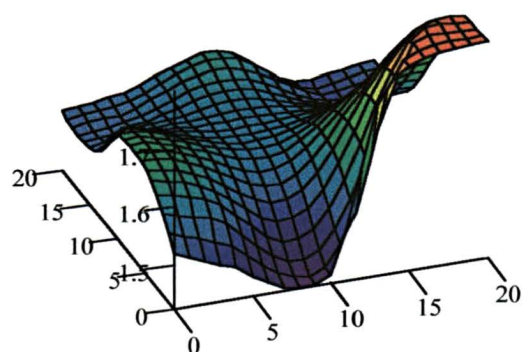
Figura 39: Superfície de resposta de otimização do processo de nitração/oxidação - planejamento em estrela para a região de absorção de $\text{COOH} + \text{COO}^-$ em 2 dimensões (A) e em 3 dimensões (B)

(A)



Fatores	-1	0	1
Concentração	0,43 mol L ⁻¹	1,00 mol L ⁻¹	1,56 mol L ⁻¹
Tempo	2 horas	6 horas	10 horas

(B)



Verifica-se, pelos resultados deste trabalho, que para a obtenção de bom rendimento na região de grupos nitro, sem grande perda na região de grupos carboxílicos e carboxilatos, pode-se optar por concentração de HNO_3 de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tempo de reação de 5 horas, aproximadamente.

4.1.1.2.3 Planejamento em Estrela - C, H, N, S

A Tabela 24 a seguir mostra os dados de Nitrogênio (N), Carbono (C), Hidrogênio (H) e Enxofre (S) para as amostras do planejamento em estrela (Tabela 19).

Tabela 24: Análise elementar (C, H, N, S e O) e razões atômicas para as amostras do planejamento em estrela

Ensaios	% C*	% H*	% N*	% S*	% O**	H/C [#]	N/C [#]	O/C [#]
PE1	46.11	6.2	3.38	6.80	37,51	1.61	0.06	0.61
PE2	47.17	6.17	3.48	6.39	36,78	1.57	0.06	0.58
PE3	46.44	5.95	3.27	5.56	38,77	1.54	0.06	0.63
PE4	45.49	6.06	4.07	7.51	36,86	1.60	0.07	0.61
PE5	46.84	6.19	3.25	5.96	37,76	1.59	0.06	0.60
PE6	46.03	6.15	3.28	6.91	37,62	1.60	0.06	0.61
PE7	44.25	6.04	3.91	7.28	38,52	1.64	0.07	0.65
PE8	45.38	6.14	3.68	8.56	36,24	1.62	0.07	0.60
PE9	45.55	6.13	3.49	8.06	36,77	1.61	0.06	0.60

*Porcentagem em massa; **Obtido pela diferença: $100 - (\%C + \%H + \%N + \%S)$; [#] Razões atômicas.

Sugere-se que as variações de concentração de HNO_3 e tempo de reação destes ensaios não foram grandes o suficiente para que sejam observados valores muito diferenciados para as relações H/C, N/C e O/C nestas amostras do Planejamento em Estrela.

4.1.2 Redução

4.1.2.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A Tabela 25 a seguir mostra a concentração de radicais livres orgânicos (RLO) verificados através da técnica de EPR para as amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9). A aquisição dos dados de RLO seguiu a metodologia descrita no item 1.4.1.

Tabela 25: Concentração de radicais livres orgânicos (RLO) observados por EPR nas amostras estudadas

Ensaio	Amostra	RLO (spins g ⁻¹)
R1	Amostra pura	1,80036e17
R2	Nitração 1M06H40 (N1)	1,72124e17
R3	SnCl ₂	3,08995e17
R4	Fe ⁰ a 60 °C em 1 mL HCl	*
R5	Fe ⁰ a 60 °C em 2 mL HCl	1,32619e17
R6	Fe ⁰ a 80 °C em 2 mL HCl	*
R7	Fe ⁰ a 80 °C em 0,5 mL H ₂ SO ₄	*
R8	Palha de aço a 80 °C em 2 mL HCl	2,30500e17
R9	FeSO ₄ a 80 °C em 2 mL HCl	8,9997e16

* Não foi possível calcular a concentração de RLO nestas amostras.

A Figura 40 a seguir mostra os dados obtidos através da técnica de EPR para as amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9). Os comentários para a amostra pura e nitrada já foram feitos no item 4.1.1.1. Apesar dos valores de RLO serem próximos em função de se trabalhar na faixa de 10¹⁵ a 10¹⁷, sugere-se que, com relação às reduções, no espectro da amostra R3 há uma certa intensificação do sinal de RLO comparada com as demais amostras, sugerindo assim maior formação de radicais semiquinona em vez de radicais quinona. Este fato pode ser melhor visualizado na Figura 41. Observa-se também

uma diminuição na intensidade do sinal de Fe^{3+} tanto na região de sítios diluídos como concentrados.

No espectro da amostra R4 se verifica uma linha de ferromagnetismo muito intensa que toma conta de todo o espectro impedindo assim maiores detalhamentos (Figura 40).

Sugere-se para a amostra R5 que o excesso de Fe^0 foi consumido pelo HCl (Figura 40).

Na Figura 40 sugere-se que o Fe^0 não foi um bom redutor de grupos nitro (NO_2) porque o sinal de RLO ficou assimétrico na amostra R6, indicando a presença deste sinal de Fe^{3+} em função dos dois sinais (RLO e Fe^{3+} em domínios concentrados, ocorrerem na mesma região de $g = 2,00$). Este sinal de RLO é semelhante ao encontrado na amostra nitrada (N_2) onde se sugere a presença de dois sinais de RLO sobrepostos (Figura 14) em função do formato diferenciado do mesmo.

O espectro da amostra R7 apresentou comportamento semelhante ao da amostra R4 onde também não se verifica sinal de RLO; provavelmente estes RLO foram complexados em função do meio de H_2SO_4 . (O ferro poderia complexar a semiquinona dando "quenching" no sinal do RLO) (Figura 40).

O espectro da amostra R8 apresenta um espectro semelhante a R3, pois aumenta o sinal de RLO e diminui o de Fe^{3+} (Figura 40). Aparentemente reduziu o grupo nitro porque o sinal de RLO é mais simétrico. Sugere-se a interação com nitrogênio, não mais com grupos NO_2 e sim com grupos NH_2 (Figura 41).

Figura 40: Espectros de EPR das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9) estudadas a 5000 G a temperatura ambiente

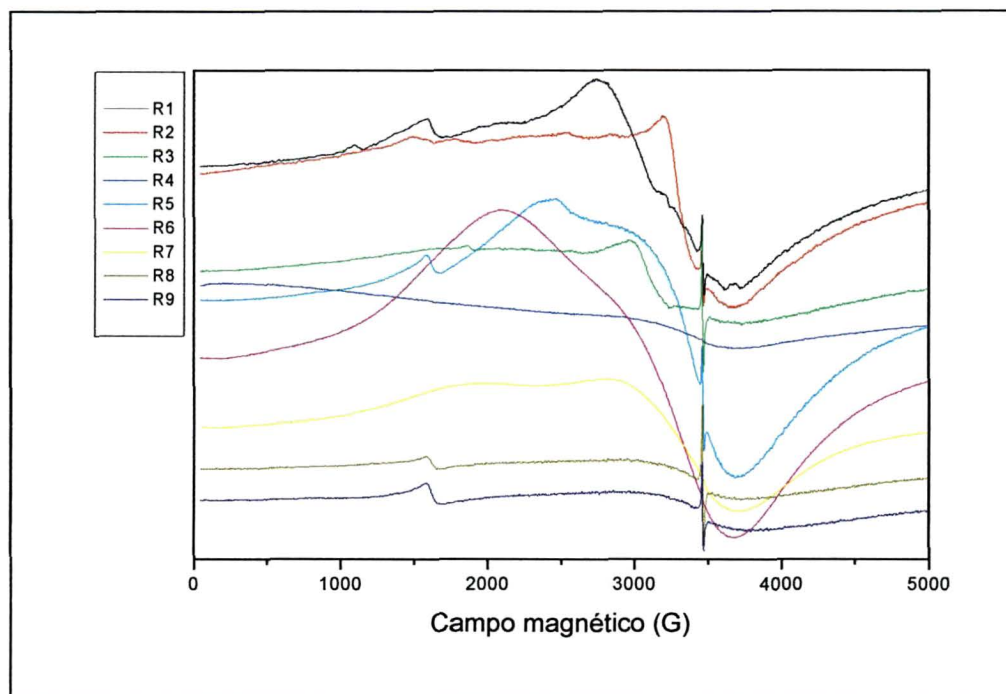
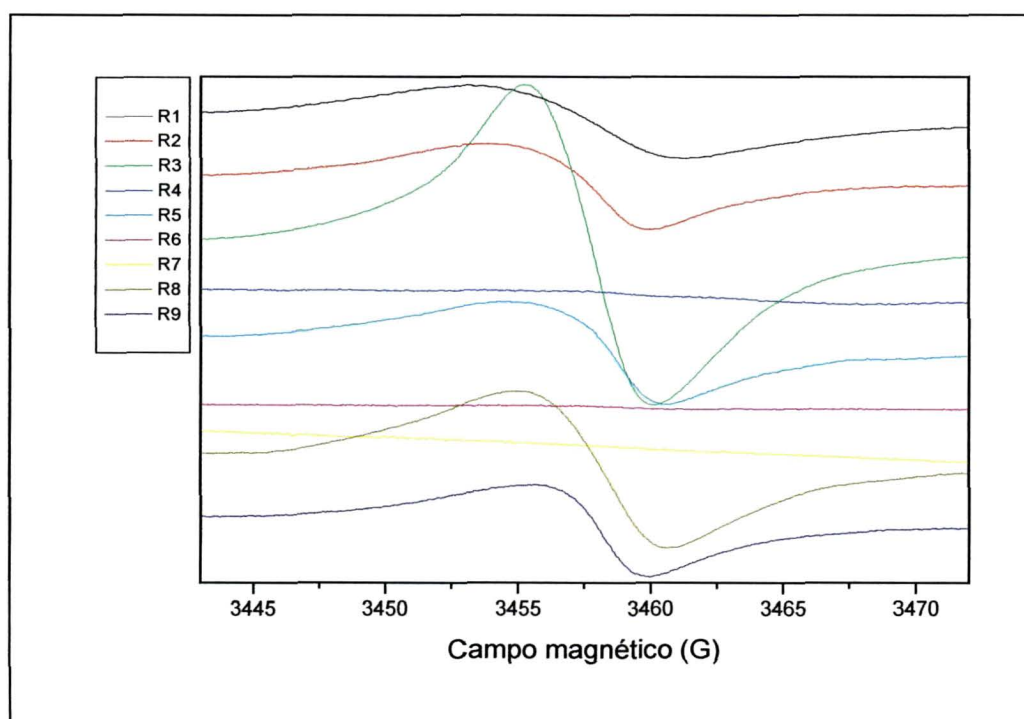


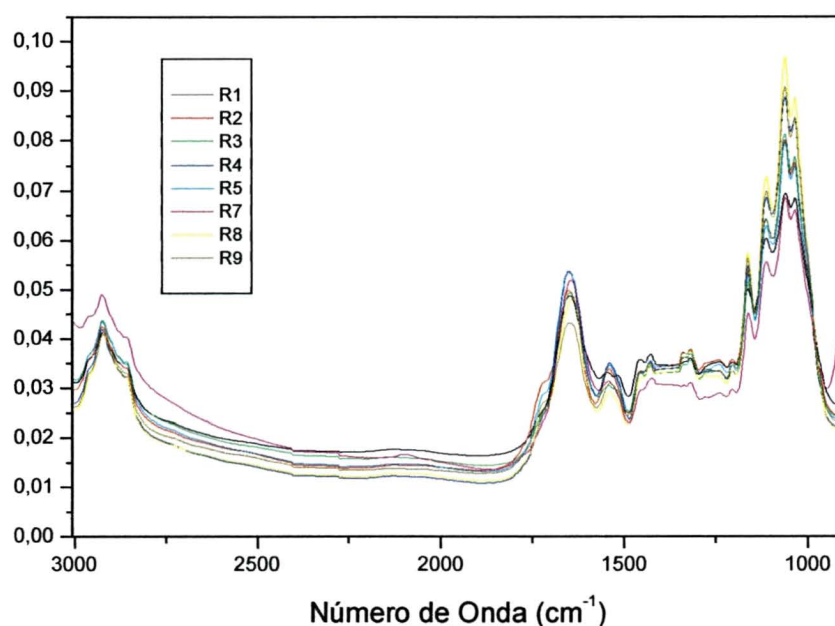
Figura 41: Espectros de EPR das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9) estudadas a 50 G a temperatura ambiente



4.1.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Absorbância (A)

A Figura 42 a seguir mostra os espectros em Absorbância (A) de FTIR das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9) onde as regiões de interesse do espectro foram selecionadas (retirada das áreas de H₂O, CO₂, nitrato e sulfato (1000 – 400 cm⁻¹)), alisadas (minimização dos ruídos) e normalizadas (minimização da variação do caminho ótico).

Figura 42: Espectros de FTIR em absorbância (A) das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9) cortadas, alisadas e normalizadas



Na Tabela 26 se verificam os ensaios realizados e as áreas calculadas à partir dos espectros de FTIR visualizados na Figura 42 para as amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9). Nas regiões de interesse (item 4.1.1.2.2) do espectro de FTIR se observa que para a região de grupos NO₂ os ensaios R3, R7 e R8 apresentaram as menores áreas sugerindo assim um processo de redução mais eficiente. É possível se optar pelo ensaio R8 (redução com palha de aço) por ser um processo mais econômico que o R7 (Fe⁰) e mais viável em termos

ambientais que o R3 (SnCl_2), pois com este se adiciona ao meio o elemento estanho.

As amostras R5, R7 e R8 apresentaram maiores áreas na região de C-O carboidratos sugerindo uma maior concentração destes na fração sólida e a amostra R9 apresentou menor valor de área indicando uma maior concentração destes grupos na fração solúvel.

Para as regiões de C-H alifático em relação aos valores do lodo biológico se observa uma diminuição dos valores de área para a amostra R7 comparativamente às demais, sugerindo assim que o meio de H_2SO_4 solubilizou estes C-H alifáticos passando os mesmos para a solução.

Tabela 26: Resultados do planejamento estrela para as áreas calculadas a partir dos espectros de FTIR das amostras pura (R1), nitrada (R2) e reduzidas (R3 a R9)

	Ensaio			Área
	(NO_2)	($\text{COOH}+\text{COO}^-$)	(C-O carb.)	(C-H alif.)
R1	0.12592	1.79399	0.14289	1.18703
R2	0.34175	2.45123	0.14421	1.46741
R3	0.16746	2.12289	0.15033	1.32961
R4	0.40272	2.41259	0.15567	1.62456
R5	0.3305	2.60023	0.18511	1.43521
R6				
R7	0.19504	2.11763	0.19304	0.81153
R8	0.1885	2.3212	0.18342	1.68586
R9	0.23808	1.97016	0.11663	1.64239

4.1.3 Nitração/Redução

Para avaliarmos se o processo de nitração e redução foi realmente eficiente, se realizou ensaios onde se fez a nitração no melhor ponto encontrado (concentração de HNO_3 de $1,50 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de reação de 5 horas e

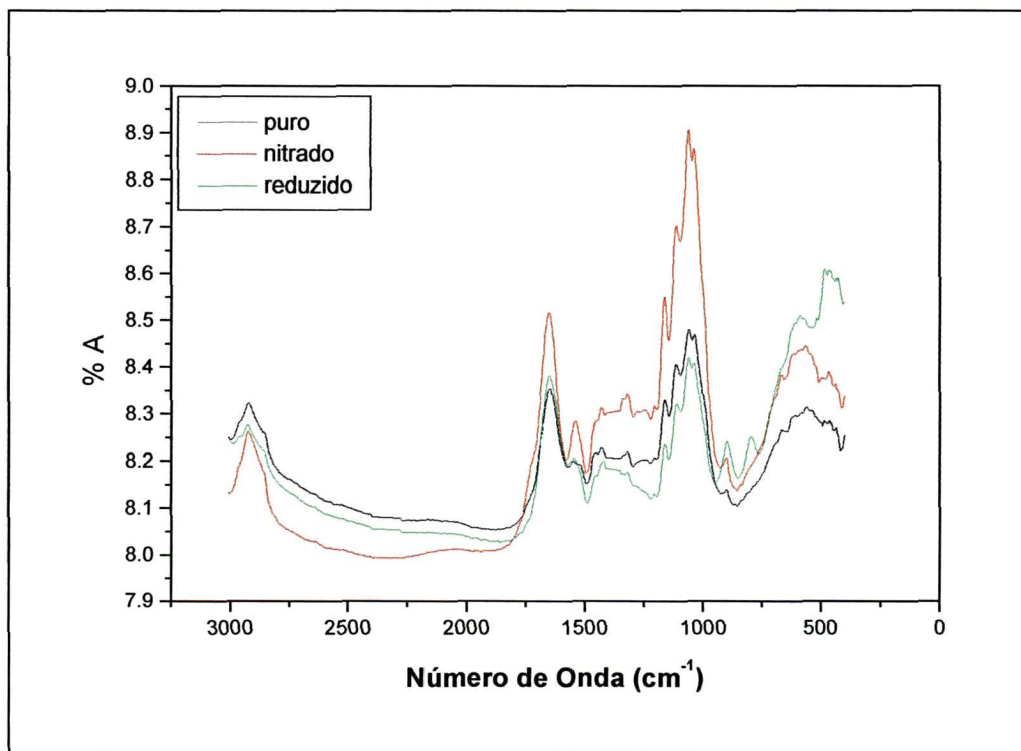
temperatura de 40 °C) e logo após foi efetuada a redução da substância nitro-húmica com o melhor redutor estudado (palha de aço), no mesmo sistema.

Foi coletada uma fração do lodo biológico após a nitrificação, antes da adição do agente redutor, e uma outra fração após a redução, para a análise de FTIR.

4.1.3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Absorbância (A)

A Figura 43 a seguir mostra os espectros de FTIR, alisados, normalizados e em absorbância da amostra nitrada/reduzida em processo contínuo onde foram retiradas as regiões do espectro que não eram interessantes ao estudo, como a região de H₂O, CO₂ e nitrato.

Figura 43: Espectros de FTIR em absorbância (A) cortados, alisados e normalizados, da amostra nitrada/reduzida em processo contínuo: pura, nitrada e reduzida



Verifica-se pela Figura 43 que o pico referente ao grupo nitro aumentou na amostra nitrada em relação à amostra pura e diminuiu consideravelmente da amostra nitrada para a amostra reduzida, mostrando que o processo contínuo pode ser adotado. Na Tabela 28 se verificam as áreas calculadas pelo programa Origin para a região de grupos nitro ($1581-1485\text{ cm}^{-1}$) para o lodo biológico puro, nitrado e reduzido.

Tabela 28: Áreas calculadas a partir dos espectros de FTIR do lodo biológico nitrado/reduzido em processo contínuo.

Lodo Biológico	Área da região de $1581-1485\text{ cm}^{-1}$
Puro	1,23
Nitrado	3,73
Reduzido	1,86

A partir das áreas calculadas se pode verificar que a área de grupos nitro no lodo biológico nitrado triplicou em relação ao lodo biológico puro, e que a área de NO_2 no lodo reduzido atingiu valores bem menores quando relacionados com a amostra pura.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO.

4.2.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO - COMPARAÇÃO DE pH DE EXTRAÇÃO DE AH DE CAMPO NATIVO COM FRACIONAMENTO UTILIZANDO XAD-8 E SEM FRACIONAMENTO UTILIZANDO XAD-8

A tabela 29 a seguir mostra as amostras de ácidos húmicos extraídos de campo nativo (0 – 10 cm) utilizando-se pirofosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como agente extrator. Foram feitas extrações sequenciais a pH 7,6, 10,6 e 12,6 e repetitivas (três extrações a um mesmo pH).

Tabela 29: AH extraídos a diferentes valores de pH

Amostra	Extração	pH
AHCN7X8	1 + 2 + 3 (XAD – 8) *	7,6
AHCN176	1	7,6
AHCN276	2	7,6
AHCN376	3	7,6
AHCN10X	1 + 2 + 3 (XAD – 8) *	10,6
AHCN110	1	10,6
AHCN210	2	10,6
AHCN310	3	10,6
AHCN12X	1 + 2 + 3 (XAD – 8) *	12,6
AHCN112	1	12,6
AHCN212	2	12,6
AHCN312	3	12,6

* Amostras AHCN7X8, AHCN10X e AHCN12X: Aproximadamente 1/3 de cada extração (3 extrações) ao mesmo pH foram mescladas em apenas uma amostra. Esta amostra foi diluída em 50 L de água destilada a pH 2,0 ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) até obter-se COD – carbono orgânico diluído e então eluídas na XAD-8. Após se passa água destilada na coluna até que esta água que sai da coluna esteja livre de cloreto (chechado contra AgNO_3). A coluna é então eluída ao reverso (de baixo para cima) com $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o material colorido que sai da coluna é coletado. Este

material colorido é eluído na IR-120 e então liofilizado. A metodologia para estas operações encontra-se no fluxograma no item 3.2.6 de Materiais e Métodos.

As Figuras 44 a 62 mostram os espectros de EPR em temperatura ambiente (TA) e a 77 K para as amostras de AH extraídas de solo sob Campo Nativo a pH 7,6, 10,6 e 12,6.

As informações obtidas nos espectros em baixa temperatura (77 K) vêm a confirmar os resultados em temperatura ambiente.

Observa-se em todos os espectros de EPR em nitrogênio líquido (77 K) a pH 7,6 (amostras AHCN7X8, AHCN176, AHCN276 e AHCN376) (Figura 49) uma linha de absorção, na região de $g \sim 4,3$ e outra em $g \sim 9,0$, indicando a presença de íons Fe^{3+} de spin alto em sítios octaédricos e/ou tetraédricos com alta distorção rômica, $\lambda = E/D = 0,33$ onde E é o parâmetro de distorção rômica e D é o parâmetro de distorção axial (Mangrich e Vugman, 1998). Esta região do espectro é dita também de domínios diluídos de íons Fe^{3+} .

As amostras AHCN7X8 e AHCN276 (pH 7,6) apresentam complexos de Mn^{2+} em estruturas de esfera externa (GOODMAN e HALL, 1994) com interação hiperfina, $A = 86$ G. A Figura 46 mostra estes parâmetros em campo magnético de 600 G.

Na amostra AHCN176 detectou-se cobre divalente formando complexos de campo ligante fraco, coordenado com oxigênios. Na Figura 49 observa-se o detalhe da interação Cu^{2+} -O devido a 4 linhas entre 2700 e 3300 G, com valor de $A_{||} = 160$ G.

Na amostra AHCN276 se vê em detalhe cobre divalente formando complexos de campo ligante forte (coordenação com estruturas porfirínicas). Esta interação Cu^{2+} -N é devida as 9 linhas entre 3300 e 3460 G, com valor de $A_{N\perp} = 16$ G (SENESI, 1990) (Figura 48).

Os espectros obtidos em Nitrogênio líquido (77 K) das amostras AHCN10X, AHCN110, AHCN210 e AHCN310 (pH 10,6) são observados na figura 55. Como a pH 7,6, em todas as amostras observa-se sinal intenso na região de $g \sim 4,3$ e $g \sim 9,0$, indicando a presença de íons Fe^{3+} de spin alto em sítios octaédricos e/ou

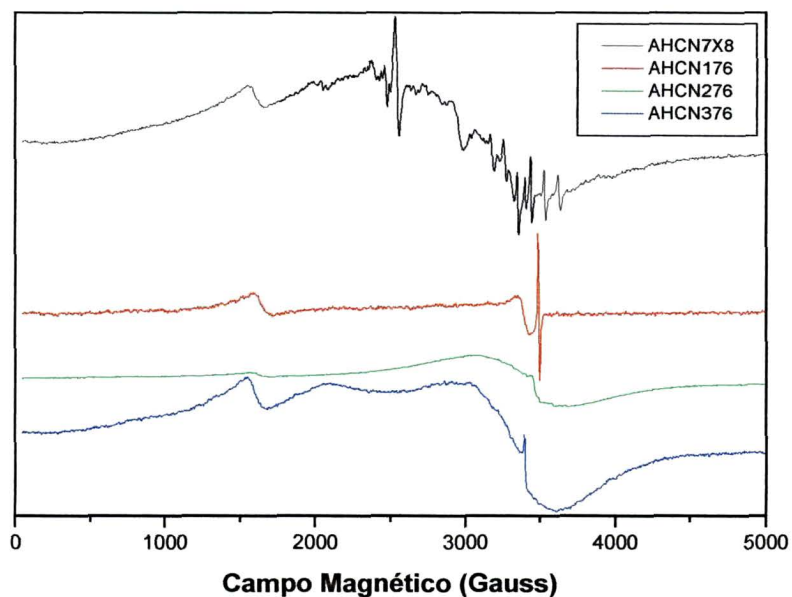
tetraédricos com alta distorção rômica, $\lambda = E/D = 0,33$. (Mangrich, 1998); e absorções na região de $g \sim 3,5$ e $g \sim 5,0$, sugerindo a presença de caulinita onde há sítio de Fe^{3+} em simetria maior que a rômica. Este dado confere com o espectro de FTIR (figura 67) onde se observam bandas típicas de caulinita nas regiões de 3700 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} . Da mesma forma que a pH 7,6, detectou-se, também, cobre divalente formando complexos de campo ligante fraco (coordenação com oxigênios) e forte (coordenação com estruturas porfirínicas, figura 53). Esta interação Cu^{2+} -N é melhor verificada em AHCN10X e AHCN110.

Como a pH 7,6 e 10,6, em todas as amostras a pH 12,6 observam-se absorções na região de $g \sim 4,3$ indicando a presença de íons Fe^{3+} , mas estas são menos intensas que a pH 7,6 e 10,6. Na região de $g \sim 9,0$, já não se observa esta absorção.

Todos os espectros (pH 7,6, 10,6 e 12,6) obtidos na faixa de campo de 0 a 5000 G, (figuras 44, 49, 51, 55, 57 e 61) apresentaram uma linha de absorção de radical livre orgânico em $g \sim 2,0$, que pode ser melhor observada nos espectros a 50 G (Figuras 47, 54 e 60).

4.2.1.1 AH de Campo Nativo - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

**Figura 44: Espectros de EPR a 5000G, em TA das amostras de campo nativo
extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8**



**Figura 45: Espectros de EPR a 2000G, em TA das amostras de campo nativo
extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8**

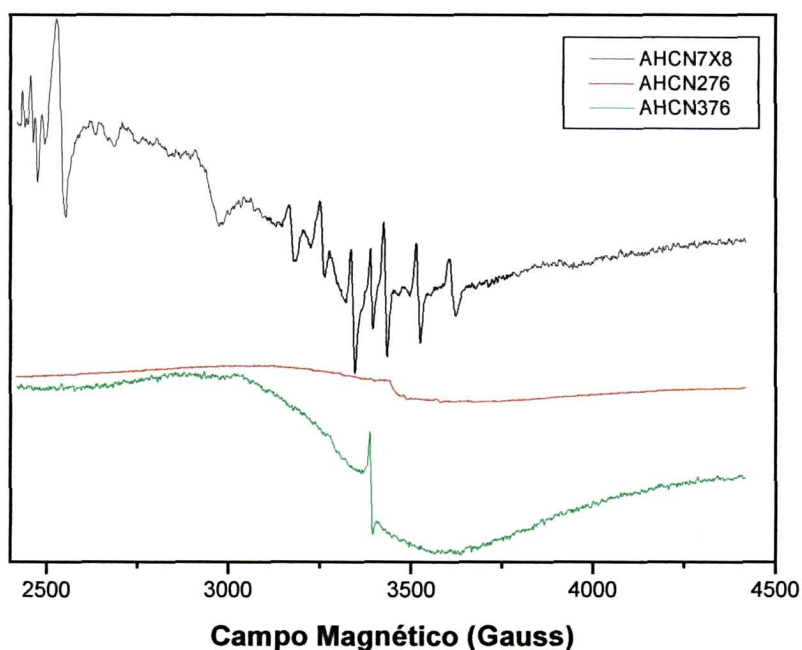
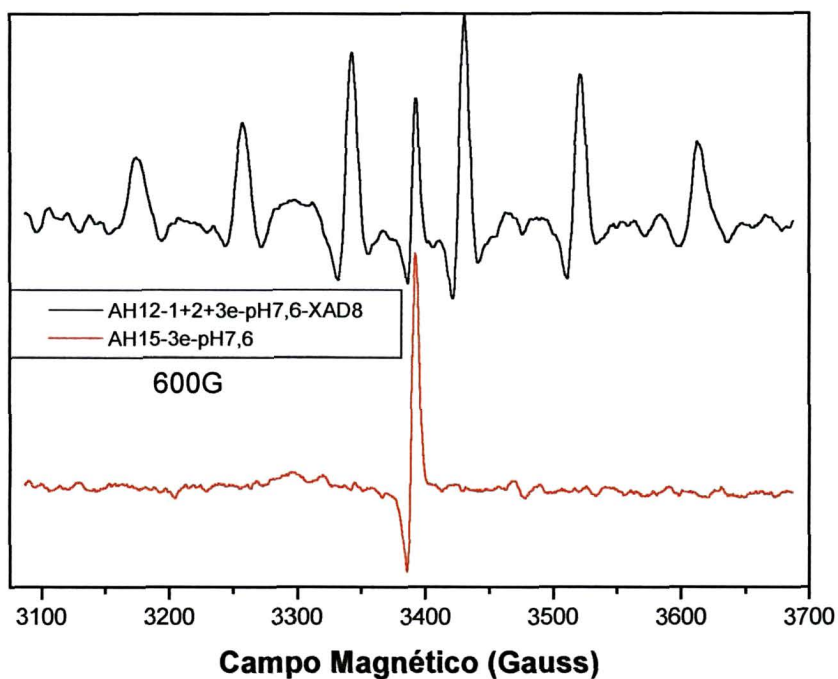


Figura 46: Espectros de EPR a 600G, em segunda derivada em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8, detalhe do Mn^{2+} *



* Onde se lê, AH12 – 1+2+3e-pH7,6-XAD8, é: AHCN7X8.
Onde se lê, AH15-3e-pH7,6, é: AHCN376.

Figura 47: Espectros de EPR a 50G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8

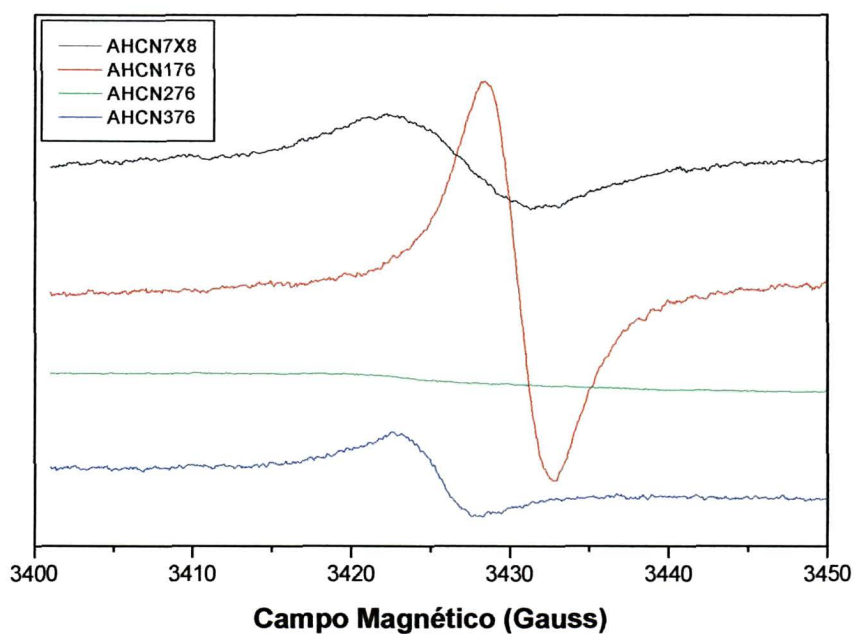


Figura 48: Espectros de EPR a 100G, em TA, em segunda derivada das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8, detalhe da interação Cu - N

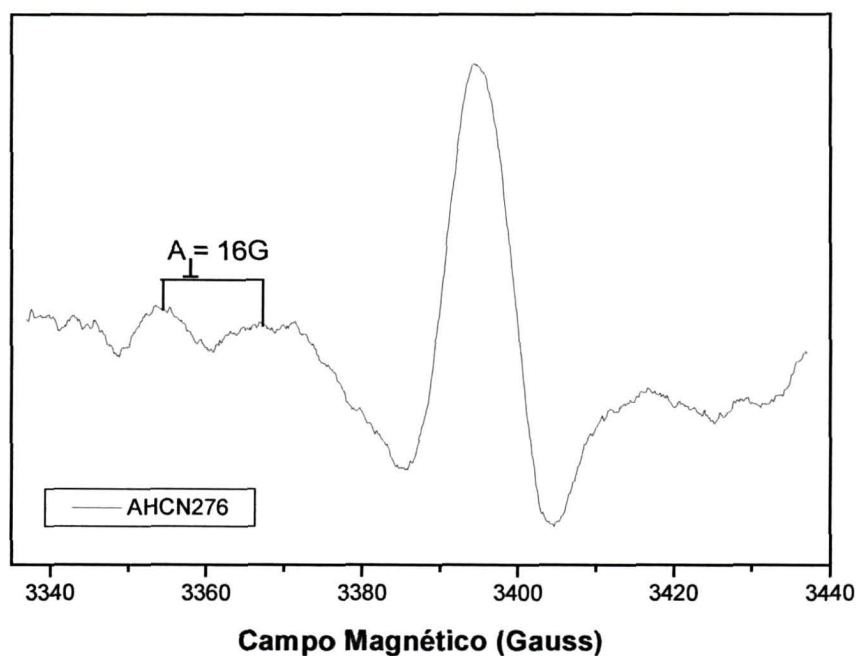


Figura 49: Espectros de EPR a 5000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8

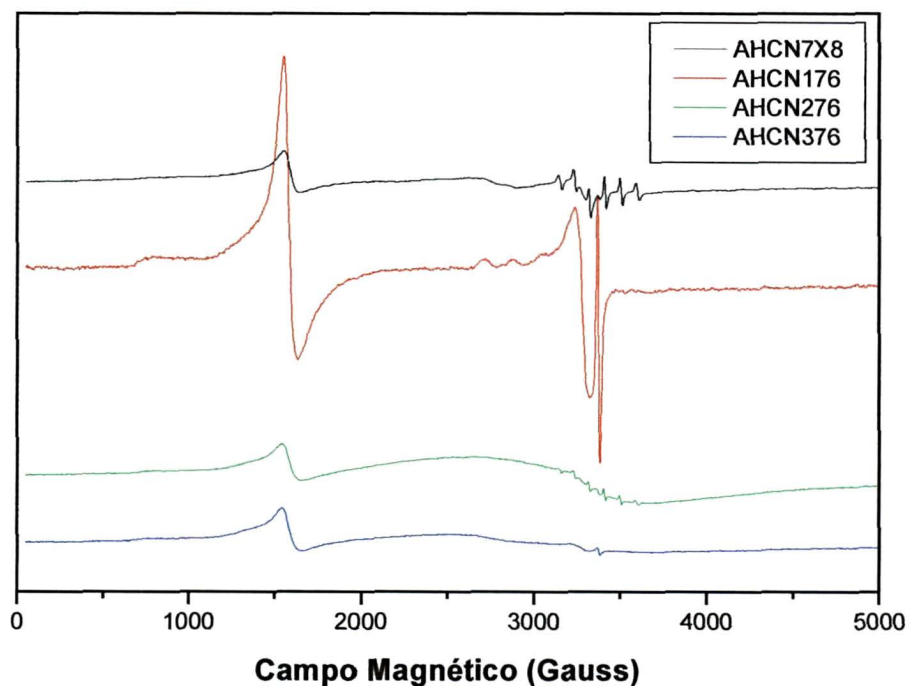


Figura 50: Espectros de EPR a 2000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 7,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

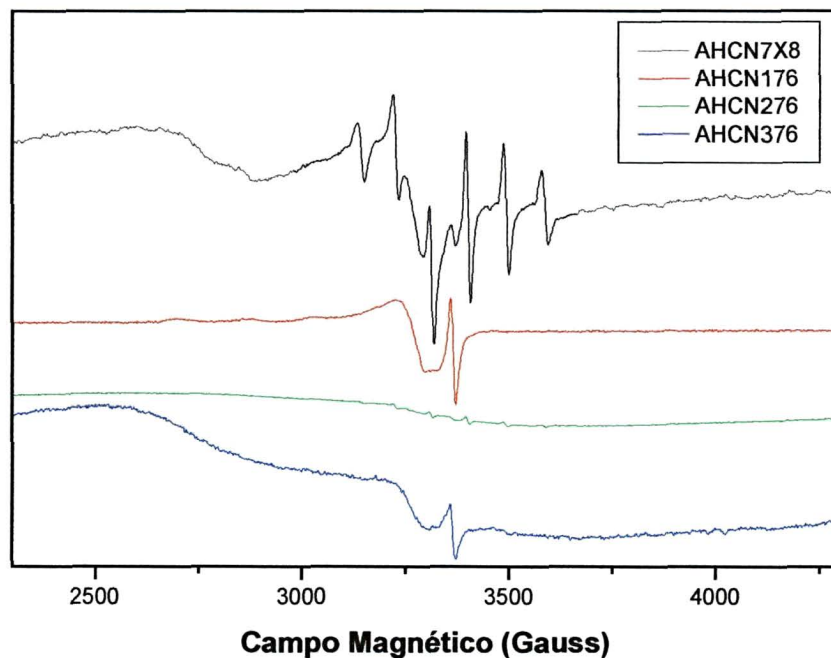


Figura 51: Espectros de EPR a 5000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8

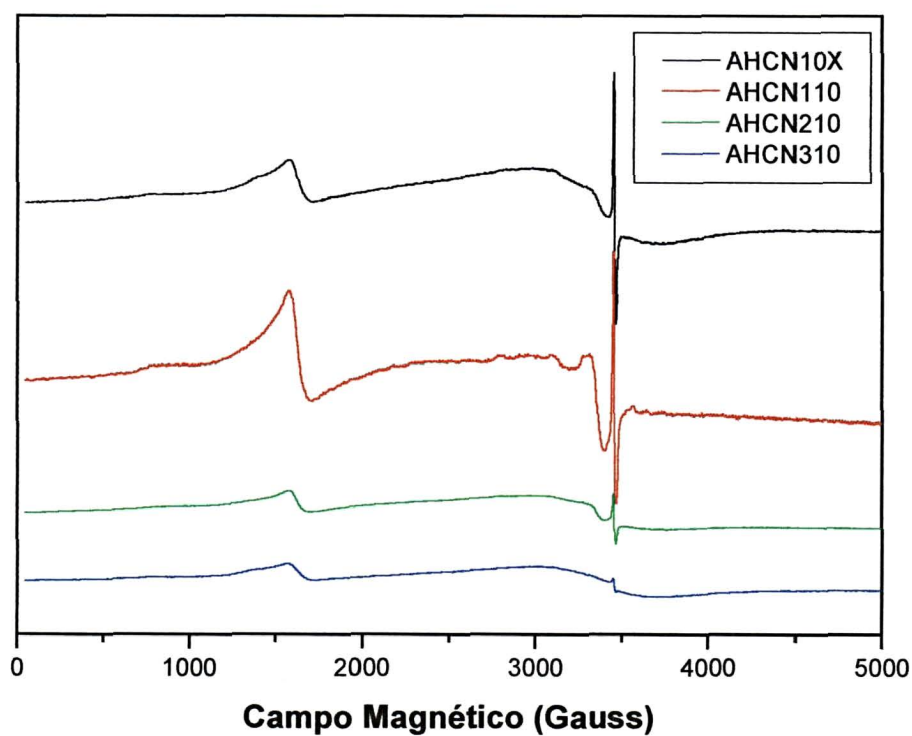


Figura 52: Espectros de EPR a 2000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD - 8

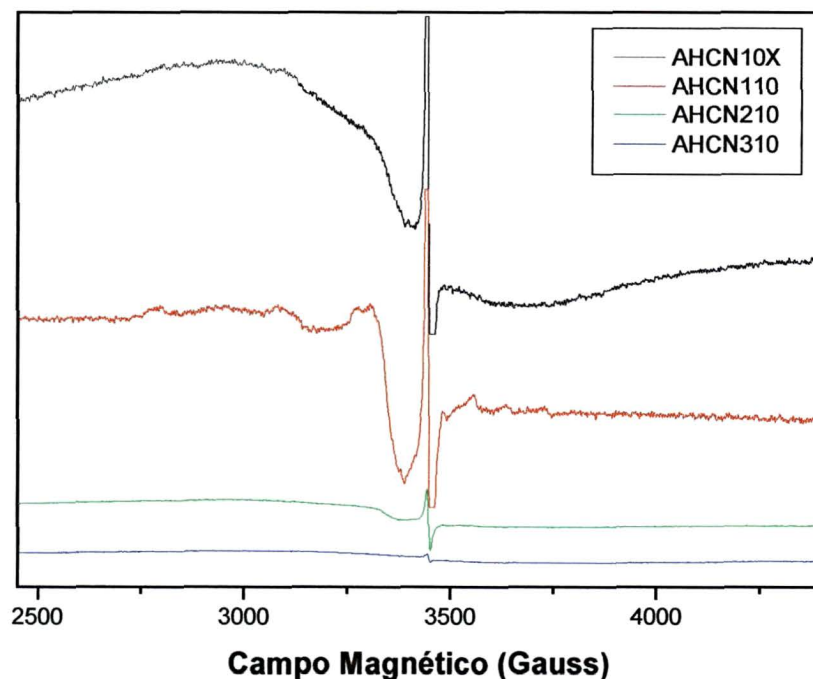


Figura 53: Espectros de EPR a 100G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8, detalhe da interação Cu-N

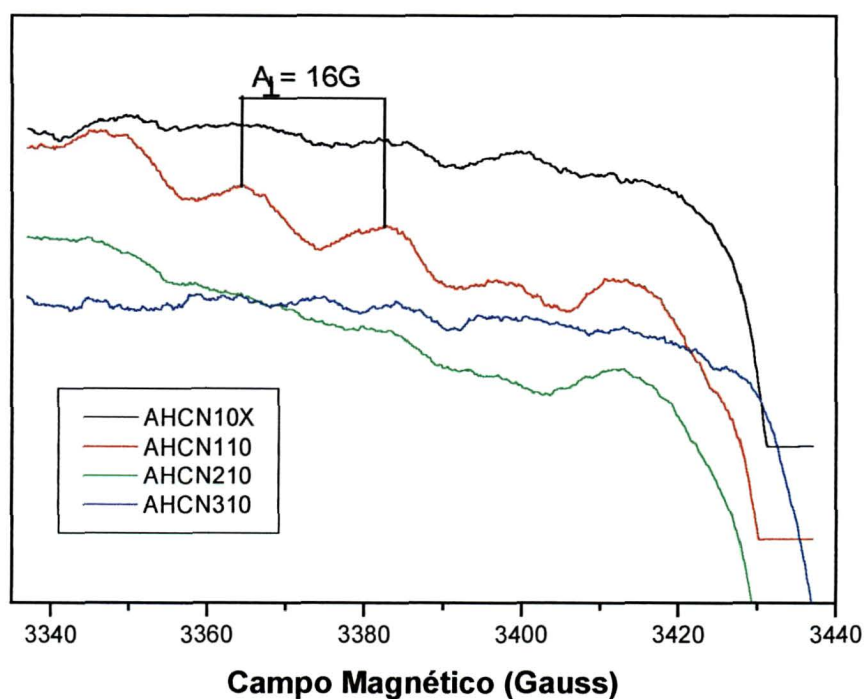


Figura 54: Espectros de EPR a 50G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

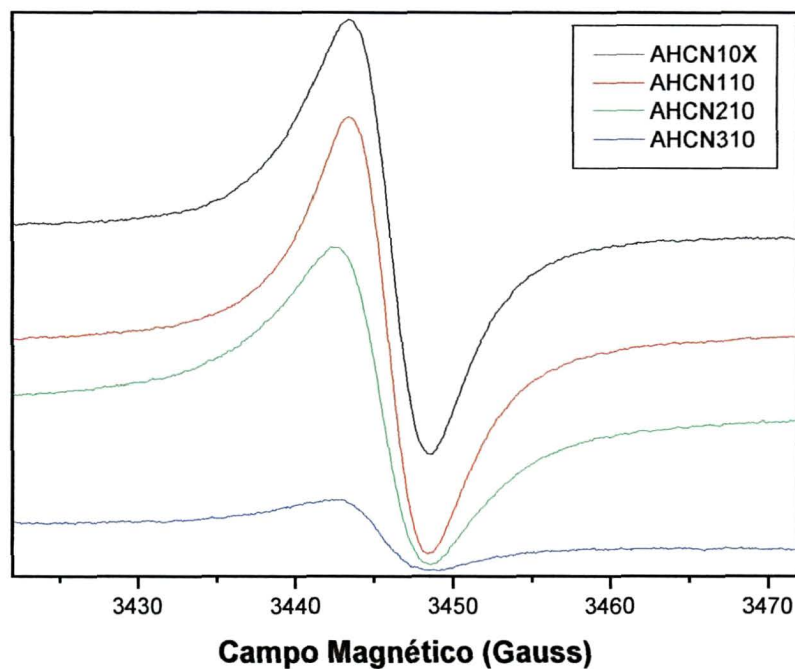


Figura 55: Espectros de EPR a 5000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

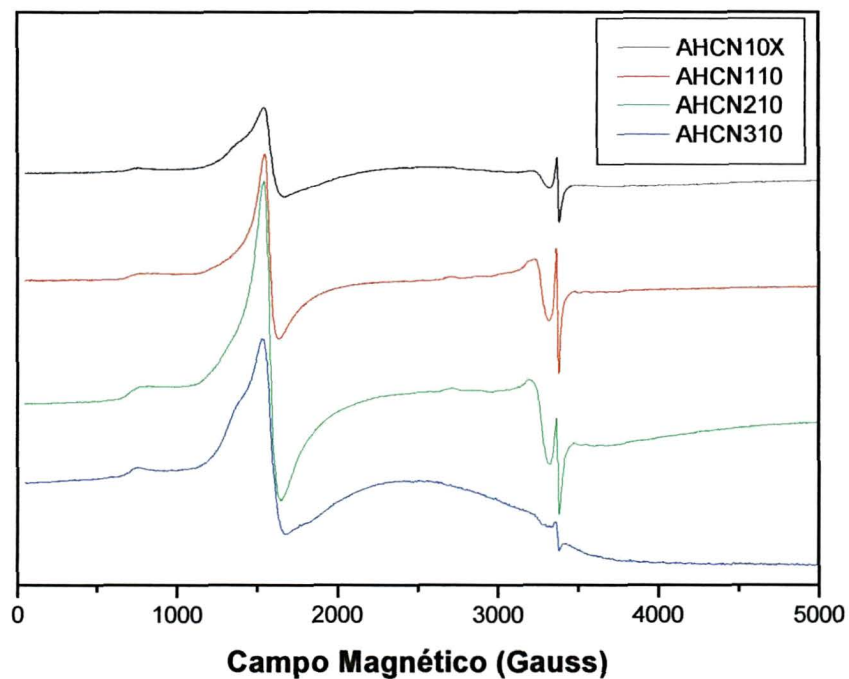


Figura 56: Espectros de EPR a 2000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 10,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

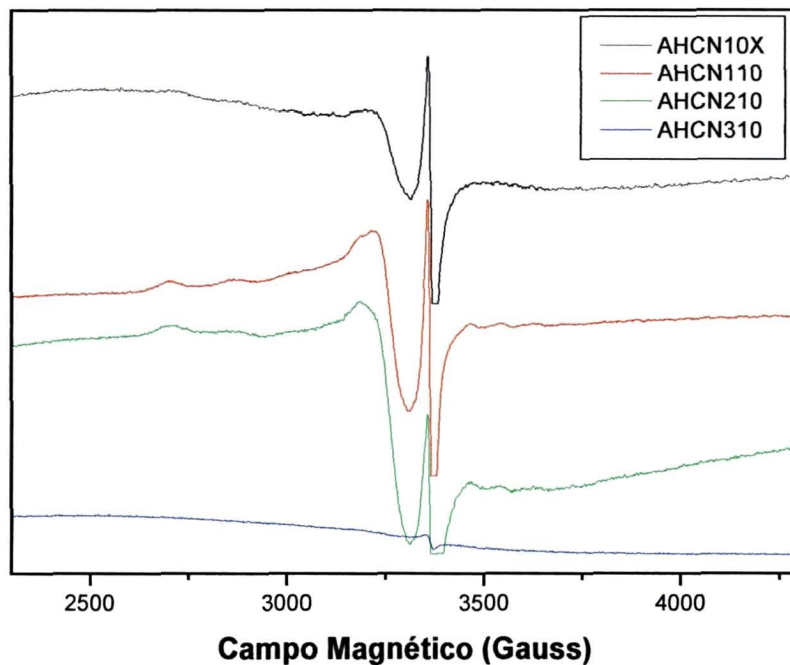


Figura 57: Espectros de EPR a 5000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

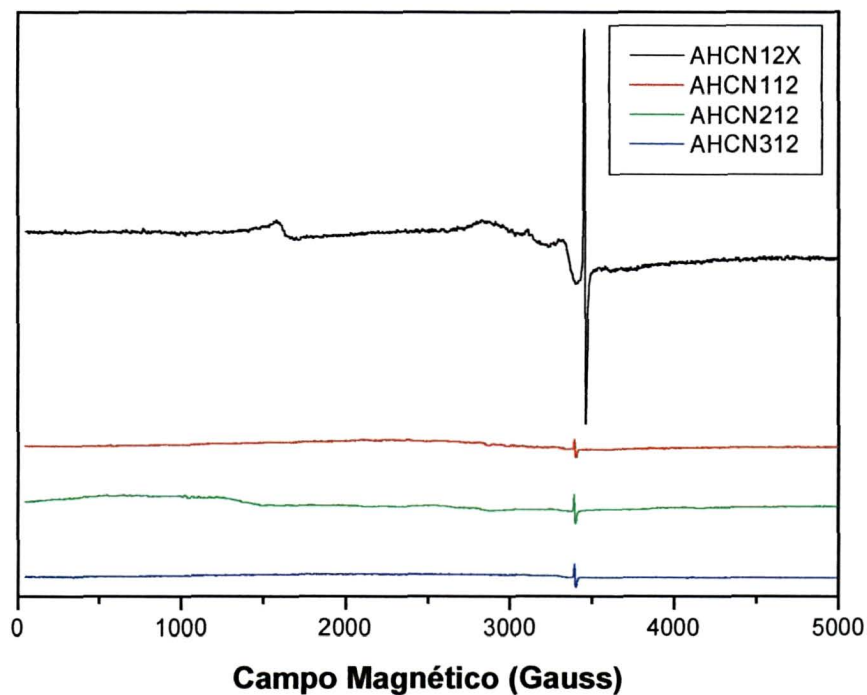


Figura 58: Espectros de EPR a 2000G, em TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

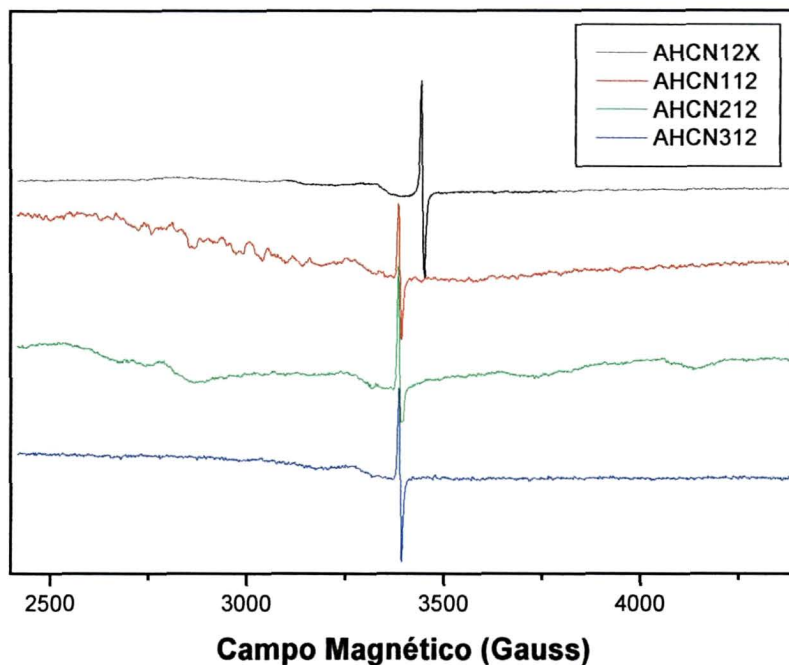


Figura 59: Espectros de EPR a 600G, a TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

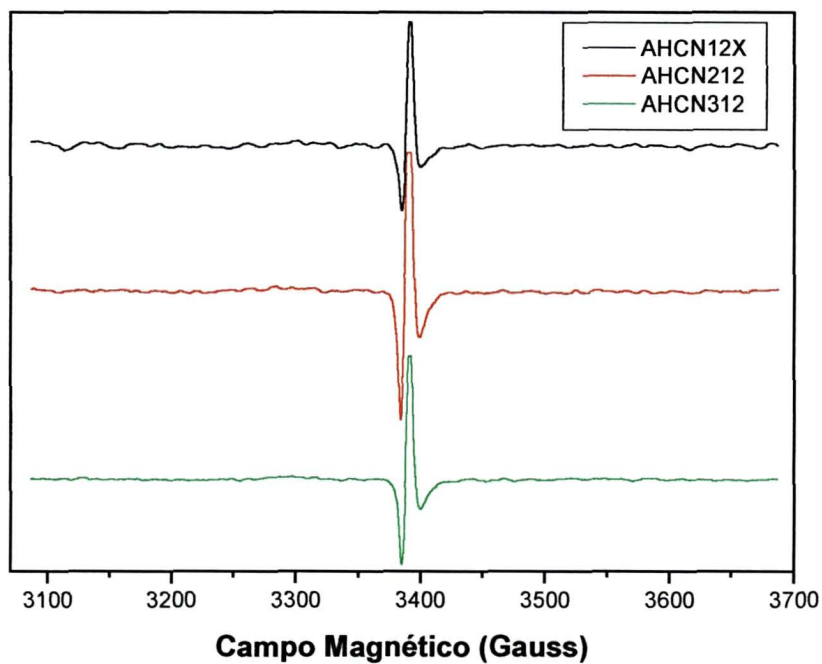


Figura 60: Espectros de EPR a 50G, a TA das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

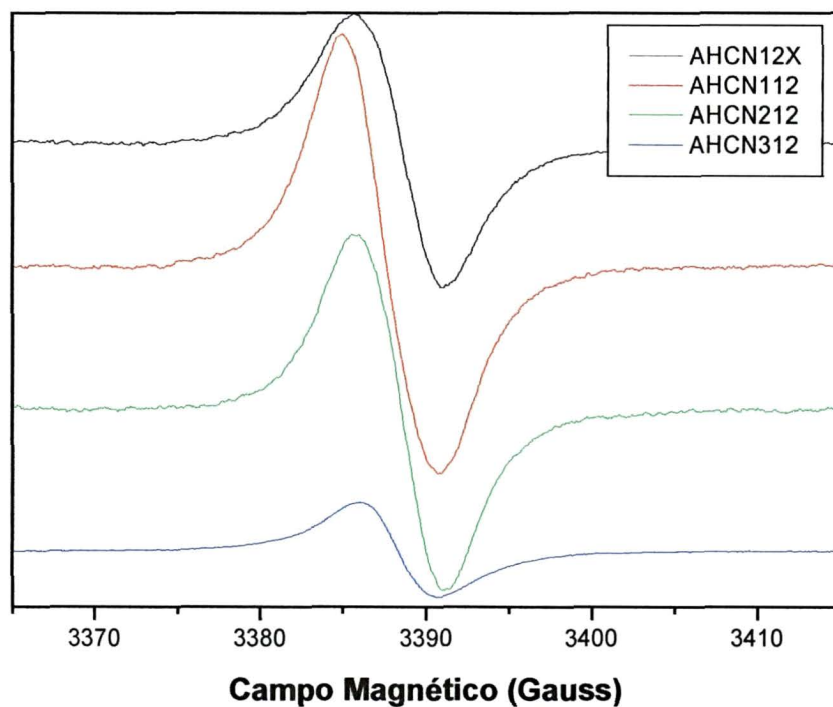


Figura 61: Espectros de EPR a 5000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8

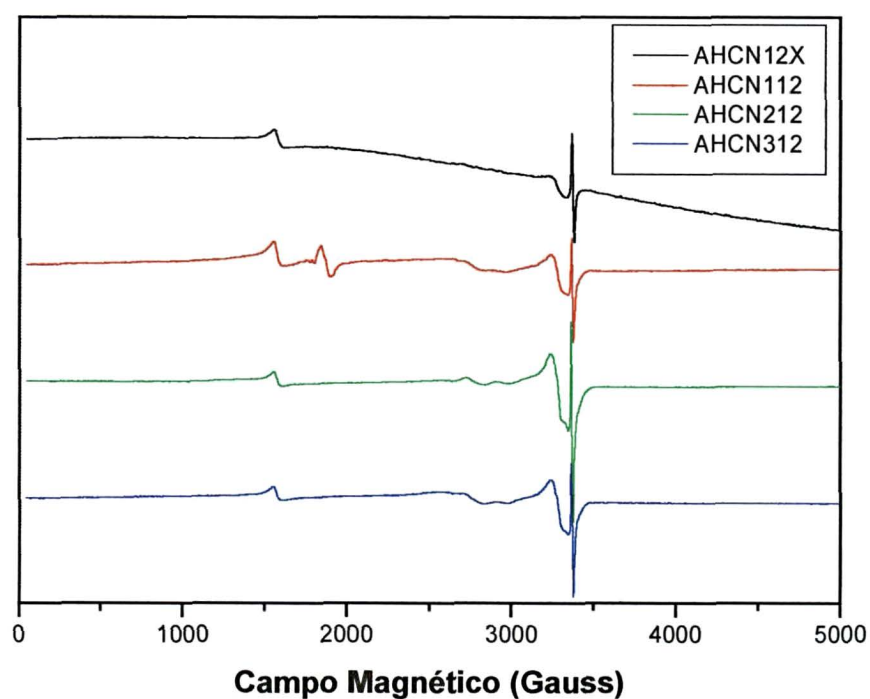
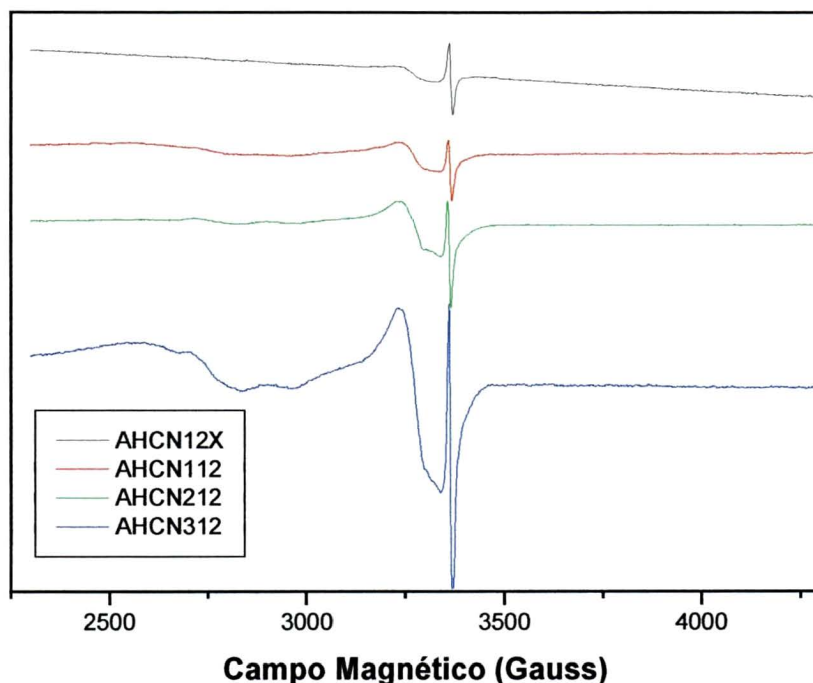


Figura 62: Espectros de EPR a 2000G em 77K das amostras de campo nativo extraídas a pH 12,6 e isoladas utilizando-se a resina XAD-8



Utilizando-se os espectros das amostras em 50 G e o espectro, também em 50 G, de uma amostra padrão de quantidade de radical livre orgânico (RLO) determinada, “Weak Pitch” (Bruker) com $1,22 \times 10^{13}$ spins cm^{-1} e $g = 2,0028$, foi determinado o número de spins g^{-1} das amostras estudadas (quantidade de radicais livres semiquinona - Tabela 30) através de tratamento matemático adequado. Nos espectros a 50 G, verificou-se que as intensidades da absorção de radical livre orgânico em $g \sim 2,0$ variaram dentre as extrações estudadas. Os valores de spins g^{-1} não se correlacionam diretamente entre as extrações, pois no processo de extração dos AH ocorre a extração de materiais orgânicos e inorgânicos presentes nas amostras.

Tabela 30: Concentração de Radicais Livres Orgânicos (RLO) nas amostras de AH extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados em resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente

Amostra	RLO (spin/g)
AHCN7X8	2,12 e+15
AHCN276	1,62 e+16
AHCN376	5,83 e+15
AHCN10X	4,44 e+16
AHCN110	3,57 e+16
AHCN210	2,48 e+16
AHCN310	1,64 e+16
AHCN12X	7,19 e+16
AHCN112	7,92 e+15
AHCN212	9,71 e+15
AHCN312	1,08 e+16

4.2.1.2 AH de Campo Nativo - Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-VIS)

As Figuras 63, 64 e 65 mostram os espectros de UV-VIS para as amostras de AH extraídas de solo sob Campo Nativo a pH 7,6, 10,6 e 12,6 respectivamente. Os resultados de UV-VIS no estado sólido mostram o efeito de deslocamento eletrônico no plano da molécula, como em solução, apresentando mais ainda, o deslocamento devido ao “empilhamento” das moléculas. Daí os valores da razão E2/E4, serem, em geral, menores que os obtidos com as amostras em solução.

Por espectroscopia de UV-VIS, sugere-se que os AH mais humificados (menor razão E4/E6), foram extraídos em pH 10,6; e os menos humificados em pH 12,6 (maior razão E4/E6), com constituição química aromática menos condensada. De modo geral, devido aos baixos valores de E2/E4 e E4/E6, tabela 31, sugere-se que estas substâncias húmicas são mais humificadas, com constituição química aromática mais condensada, indicando possível aumento da massa molecular.

Figura 63: Espectros de Ultravioleta - visível em estado sólido das amostras de ácidos húmicos extraídos a pH 7,6, isolados utilizando-se a resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente

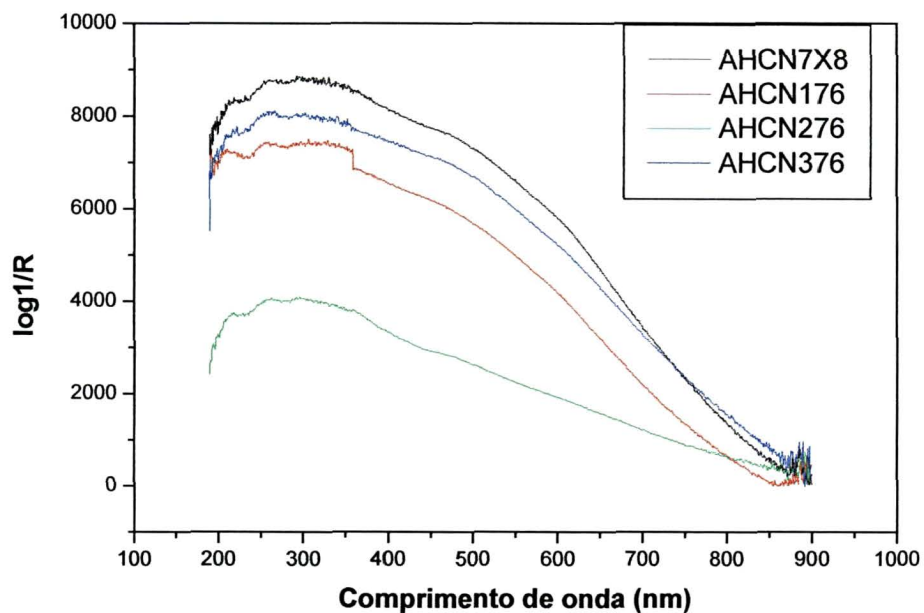


Figura 64: Espectros de Ultravioleta - visível em estado sólido das amostras de ácidos húmicos extraídos a pH 10,6, isolados utilizando-se a resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente.

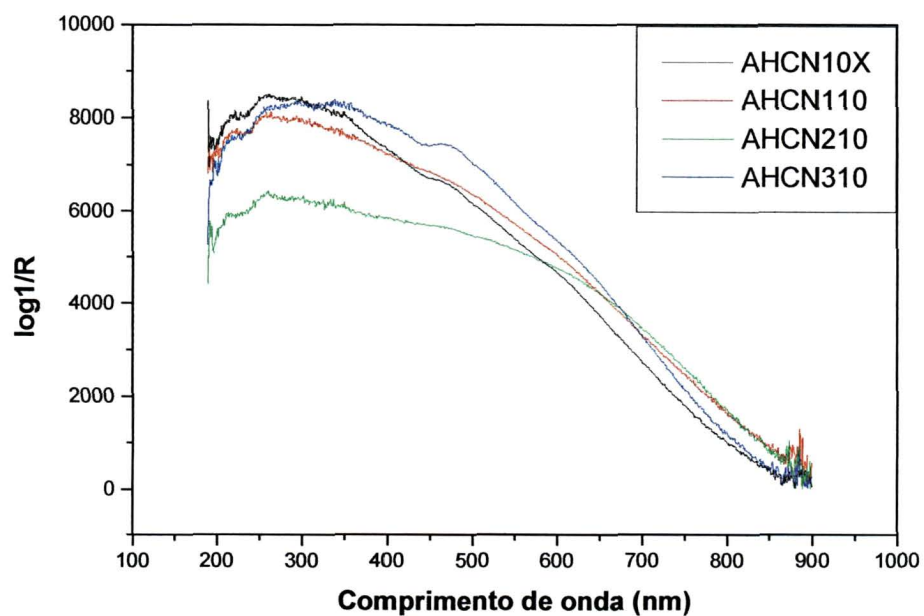


Figura 65: Espectros de Ultravioleta - visível em estado sólido das amostras de ácidos húmicos extraídos a pH 12,6, isolados utilizando-se a resina XAD8 e/ou liofilizados diretamente

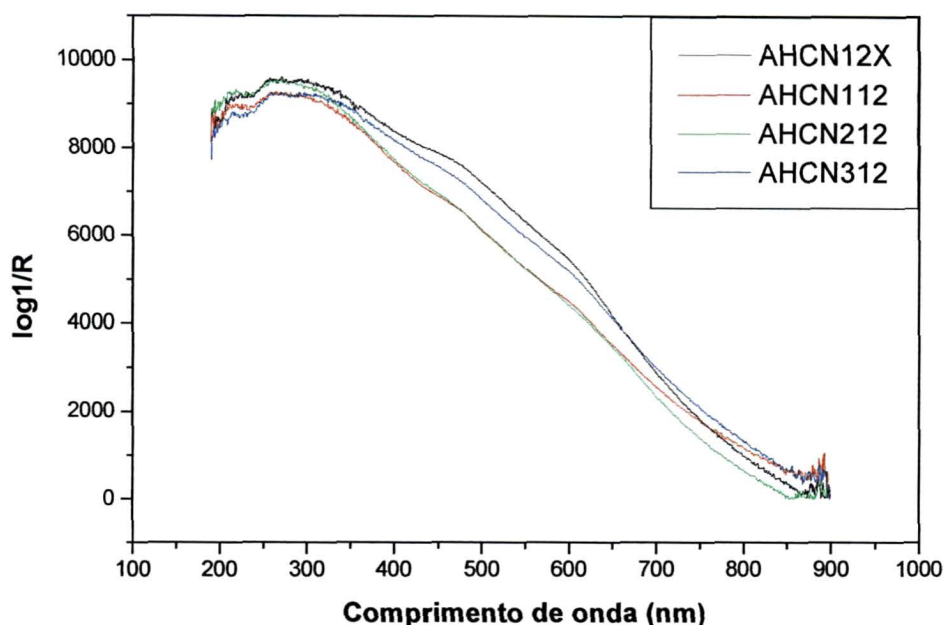


Tabela 31: Relações E2/E4 (Absorbância em 270 nm/Absorbância em 407 nm) e E4/E6 (Absorbância em 465 nm/Absorbância em 665 nm) dos AH extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados em resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente

Amostra	Relação E2/E4	Relação E4/E6
AHCN7X8	1.08	1.79
AHCN717	1.13	2.09
AHCN276	1.23	1.93
AHCN376	1.08	1.75
AHCN10X	1.16	1.93
AHCN110	1.11	1.69
AHCN210	1.08	1.40
AHCN310	1.05	1.81
AHCN12X	1.16	2.04
AHCN112	1.22	2.07
AHCN212	1.25	2.13
AHCN312	1.14	1.95

4.2.1.3 AH de Campo Nativo - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) por Transmittância (T)

As Figuras 66, 67, 68 e 69 mostram os espectros de FTIR para as amostras de AH extraídas de solo sob Campo Nativo a pH 7,6, 10,6, 12,6 e XAD-8 respectivamente.

Observa-se uma intensa banda em 3700 cm^{-1} referente à vibração O - H de grupos ν Si(O-H), O-H internos de argilas (caulinita), nas amostras AHCN7X8, AHCN376, AHCN10X, AHCN310, sendo esta menos intensa em AHCN276 (pH 7,6), AHCN110, AHCN210 (pH 10,6), AHCN12X e AHCN112 (pH 12,6). Estas bandas são mais intensas nas amostras extraídas a pH 7,6 e menos intensas nas amostras extraídas a pH 12,6 sugerindo assim, que a extração a pH 12,6 é a mais eficiente na eliminação de inorgânicos das frações AF e AH. Nas amostras AHCN176 (pH 7,6 XAD-8), AHCN212 e AHCN312 (pH 12,6) praticamente não se observa esta banda.

O mesmo comportamento é verificado para a banda em 3620 cm^{-1} . Estas bandas em $\sim 3620\text{ cm}^{-1}$ são também atribuídas a grupos O-H de illita - mineral de alumínio e magnésio; gibsitita - mineral de alumínio; montmorilonita - mineral de alumínio e magnésio (WILSON e colaboradores, 1974) e oxihidróxidos de alumínio (WILSON, 1994).

Estas mesmas bandas (3700 cm^{-1} e 3620 cm^{-1}) também são atribuídas a grupos O-H da haloisita. As vibrações de deformação angulares E-O-H (E simboliza o metal ligado ao OH) também são verificadas em $800 - 750\text{ cm}^{-1}$. Na região de $825 - 750\text{ cm}^{-1}$ esta vibração E-O-H também pode ser atribuída a illita - Al-Mg-OH (WILSON, 1994). A maior intensidade nesta banda sugere maiores teores de cinzas nas amostras.

Os prováveis elevados teores de cinzas encontrados nas amostras AHCN7X8, AHCN376, AHCN10X, AHCN310 estão em concordância também com a banda na região de 1100 cm^{-1} devido à vibração ν (Si-O) da matéria inorgânica. Estes dados concordam com os encontrados por Guimarães, 1997.

Os minerais podem ser distinguidos pelas diferenças na posição e intensidade relativa das bandas devido ao ν OH. Em geral é aceito que as bandas na região de 3700 cm^{-1} e 3620 cm^{-1} são atribuídas a argilas do tipo caulinita (Wilson, 1994). Estas vibrações também são verificadas na região do espectro de vibração angular 938 cm^{-1} (E-O-H internos as camadas da caulinita) e 912 cm^{-1} (O-H de superfície interna da caulinita). Estas vibrações em 938 cm^{-1} são mais intensas nas amostras AHCN7X8, AHCN376, AHCN10X e AHCN310 e estas vibrações em 912 cm^{-1} são mais intensas nas AHCN7X8, AHCN276, AHCN376, AHCN10X e AHCN310.

As bandas em 3620 cm^{-1} , 3527 cm^{-1} , 3391 cm^{-1} e 3373 cm^{-1} e a deformação de E-O-H que também pode ser observada em 1017 cm^{-1} , são devidas a minerais de hidróxido de alumínio – gibsita (E-Al). A banda larga em 3445 cm^{-1} é atribuída à vibração O-H de grupos alcoólicos, fenólicos (Silverstein, 1979) e N-H com os mais diversos tipos de pontes de hidrogênio. Estas bandas são mais intensas nas amostras AHCN276, AHCN376 e AHCN310 e menos intensas em AHCN7X8, AHCN10X, AHCN110 e AHCN210 (pH 10,6). Nas amostras AHCN176 (pH 7,6), AHCN12X, AHCN112, AHCN212 e AHCN312 (pH 12,6) não se observam estas bandas. A diminuição de intensidade destas bandas pode ser atribuída ao processo seqüencial de solventes extratores (pH 7,6, 10,6 e 12,6).

A fraca banda em $3370 - 3380\text{ cm}^{-1}$ pode ser também atribuída ao estiramento de O-H fenólico (contribuição de OH fenólico, H_2O e possivelmente N-H, Niemeyer e colaboradores, 1992) e esta banda apresenta o mesmo comportamento da banda em 3445 cm^{-1} . A atribuição deste estiramento OH de grupos fenólicos é suportada pela banda centrada em 1260 cm^{-1} devido ao estiramento C-OH, característica de C-OH em anel aromático.

As vibrações do grupo Si (O-H) ocorrem na mesma região em que são observados os estiramentos dos álcoois, $3700 - 3200\text{ cm}^{-1}$. Como nos álcoois, a absorção característica depende do grau de pontes de hidrogênio (Silverstein, 1979).

As bandas na região de 2930 cm^{-1} estiramento de C-H alifático, atribuída a vibração (C-H) anti-simétrico de $-\text{CH}_3$ (Celi e colaboradores, 1996) e 2850 cm^{-1} , que é atribuído a estiramento CH simétrico de $-\text{CH}_2$ (Celi e colaboradores, 1996) são mais intensas nas amostras AHCN12X, AHCN112 e AHCN312 (extrações a pH 12,6) indicando assim, maiores teores de componentes alifáticos na amostra e menos intensas em AHCN7X8, AHCN176 e AHCN276 (extrações a pH 7,6). Estes dados estão em concordância com os encontrados por Niemeyer e colaboradores, 1992 e com os dados de UV-VIS deste trabalho.

As bandas a $1720 - 1700\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a vibrações $\nu(\text{O}-\text{C}=\text{O})$ de ésteres ou vibrações $\nu(\text{C}=\text{O})$ de cetonas (Naidja e colaboradores, 2002, Guimarães, 1997 e Celi e colaboradores, 1996) e $1640 - 1620\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C=O de grupo amida – banda de amida I, C=C de anel aromático, deformação axial de C=C, C=N, absorção anti-simétrica de C=O de COO^- e deformação angular de H_2O) (Niemeyer e colaboradores, 1992, Baes e Bloom, 1989; Celi e colaboradores, 1996 e Guimarães, 1997). A banda na região de 1630 cm^{-1} pode ser também indicadora do teor de matéria orgânica. Estas bandas são mais intensas em AHCN7X8, AHCN176 e AHCN12X e menos intensas em AHCN276, AHCN376 (extrações a pH 7, 6), AHCN10X, AHCN110 AHCN210 e AHCN310 (extrações a pH 10,6). A pH 12,6 (AHCN112, AH212 e AH312) observam-se duas bandas largas na região de $1650 - 1570\text{ cm}^{-1}$. Esta banda é mais intensa na amostra AHCN312, sugerindo maior teor de matéria orgânica extraída, indicando assim a eficiência do processo seqüencial de extração. Isto é suportado pela pequena banda em 1510 cm^{-1} observada nas amostras AHCN12X, AHCN112 e AHCN212 (pH 12,6) atribuída a C=C de anéis aromáticos e pela banda em 1384 cm^{-1} atribuída a $\nu(\text{C}=\text{O})$ de COO^- .

Sugere-se que quanto maior o pH das soluções extratoras maior será a intensidade das bandas na região de carboxilatos (1630 cm^{-1}) e menor a intensidade nos grupos carboxílicos (COOH) na região de 1720 cm^{-1} devido à dissociação desses grupos pela crescente concentração de OH^- .

Observa-se uma banda em $1260 - 1270\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C-OH) intensa em pH 12,6 (AHCN12X, AHCN112 e AHCN212).

As bandas de absorção na região de 1000-1200 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C-O})$ de polissacarídeos (carboidratos) (Stevenson e Goh, 1974, Stevenson, 1982 e Niemeyer e colaboradores, 1992) provavelmente celulose e hemicelulose residual (Inbar e colaboradores, 1989), ou a impurezas de silicatos, estiramento $\nu(\text{Si-O})$ (Guimarães, 1997). Niemeyer e colaboradores, 1992, citam que nesta região a intensidade dos picos decresce com o aumento da humificação.

As bandas em 1100 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} e 1008 cm^{-1} atribuídas a estiramento C-O de carboidratos e outros álcoois e ésteres (1080 cm^{-1}) e Si-O de silicatos (1034 cm^{-1}), são mais intensas nas amostras AHCN7X8, AHCN276, AHCN376, AHCN10X e AHCN310; e menos intensas nas amostras AHCN210, AHCN12X e AHCN112. Não se verifica esta banda em AHCH176 e AHCN212. Na amostra AHCN110 somente se verifica a banda em 1034 cm^{-1} .

A banda em 912 cm^{-1} é atribuída a grupos oxigenados aromáticos, tais como éter aromático e também é atribuída a misturas sílica – silicatos – caulinitas. Esta banda é mais intensa nas amostras AHCN7X8, AHCN276, AHCN376, AHCN10X e AHCN310 e menos intensa nas amostras, AHCN110, AHCN210, AHCN12X e AHCN112. Esta banda não é verificada em AHCN176 e AHCN212.

As bandas em 800 cm^{-1} , 750 - 730 cm^{-1} , 538 cm^{-1} , 468 cm^{-1} e 430 cm^{-1} seguem esta mesma tendência.

A Tabela 32 a seguir mostra as principais bandas dos espectros de FTIR e suas respectivas atribuições.

Tabela 32: Atribuições das bandas de FTIR para AH extraídos de solo sob campo nativo a diferentes pH de extração

Número de Onda (cm^{-1})	Atribuições
3700	ν OH (caulinita)
3700 – 3600	ν Al-OH, ν Fe-OH e ν Si-OH (argilas)
3400 – 3300	ν Al-OH, ν Fe-OH (argilas) e/ou ν OH (fenol, H_2O), ν NH
3100 – 3070	ν CH (aromático – olefinas)
2940 – 2850	ν CH (CH_3 e CH_2 de alifático)
2630 – 2500	ν OH (COOH) e/ou 2ν OH (COOH)
2000	Banda de combinação C-O de carboidrato
1720 – 1700	ν C=O (ésteres, cetonas, COOH), ν C=C (aromático)
1660 – 1620	ν C=O (COO^- , amida I), δ OH (H_2O) ν C=C (anel aromático ou de alifático insaturado, ν C=N
1600- 1500	ν C=C (anel aromático) , Amida II, δ CH de CH_3
1400- 1300	δ CH de CH_3 ν C=O (COO^-)
1260	ν CO (COOH) e ν C-OH (aromático)
1200-1000	C-C alifático, ν C-O de carboidrato, álcoois e ésteres, Si-O-C de substâncias poliméricas, ν Si-O (matéria inorgânica)
1040-1020	Si-O e Al-O
938 e 912	Al-OH (caulinita)
800-750	Si-O-Al, Si-O-Fe e Al-Mg-OH de argila
640 e 550	Si-O-Al
462	Si-O-Fe

Figura 66: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos ácidos húmicos (AH) de campo nativo extraídos a pH 7,6, isolados utilizando-se resina XAD-8 (AH 12) e/ou liofilizados diretamente

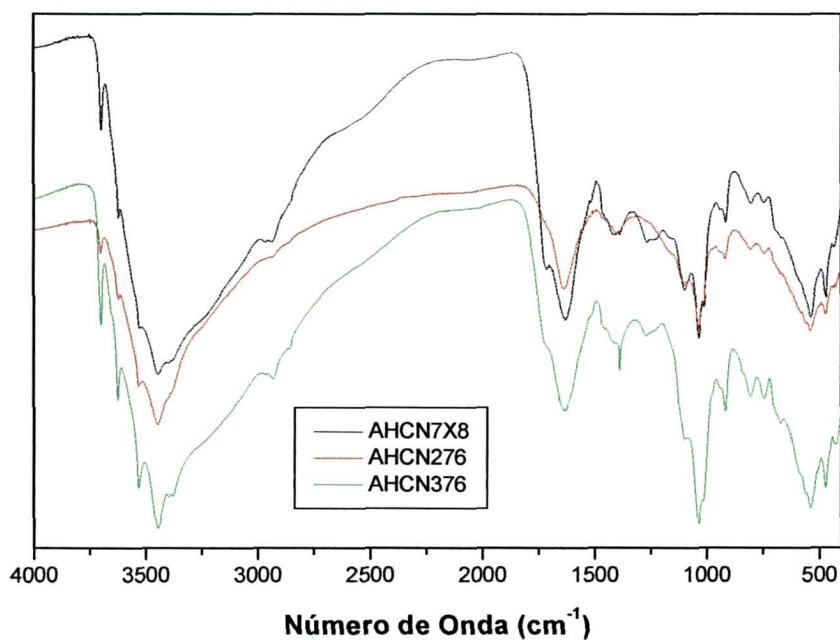


Figura 67: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos AH de campo nativo extraídos a pH 10,6, isolados utilizando-se resina XAD-8 e liofilizados diretamente

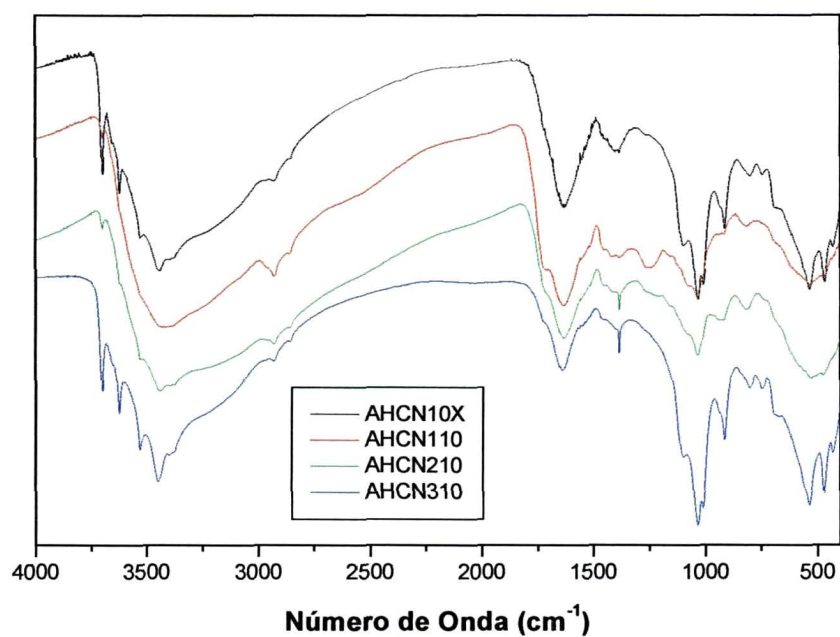


Figura 68: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos AH de campo nativo extraídos a pH 12,6, isolados utilizando-se resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente

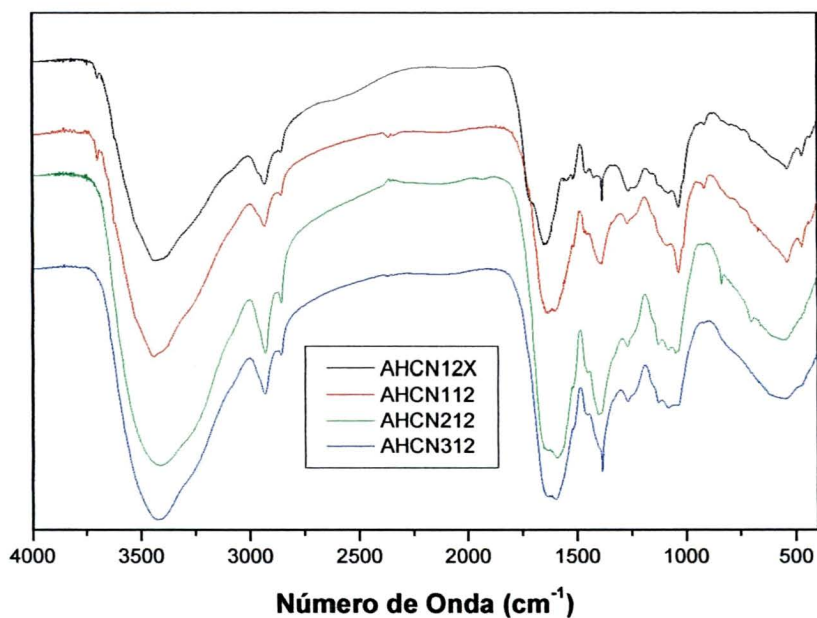
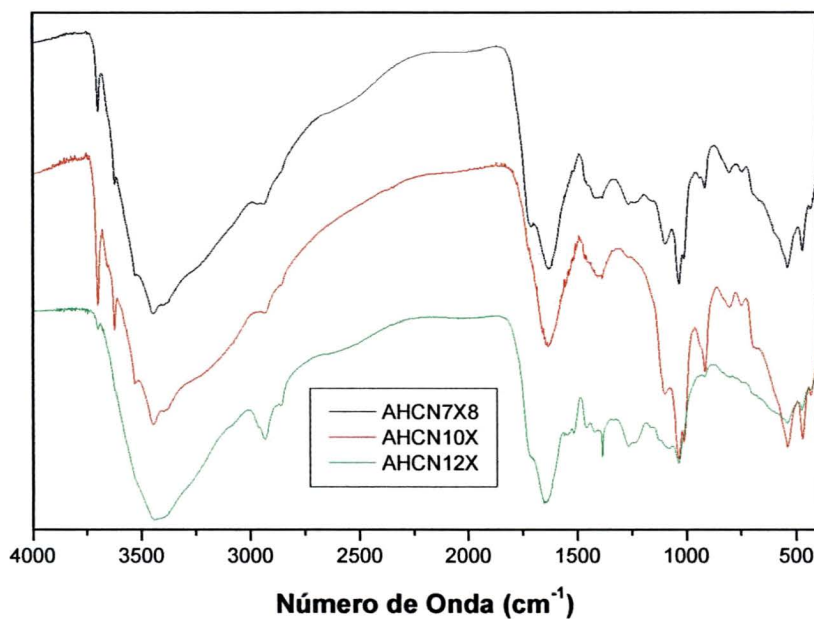


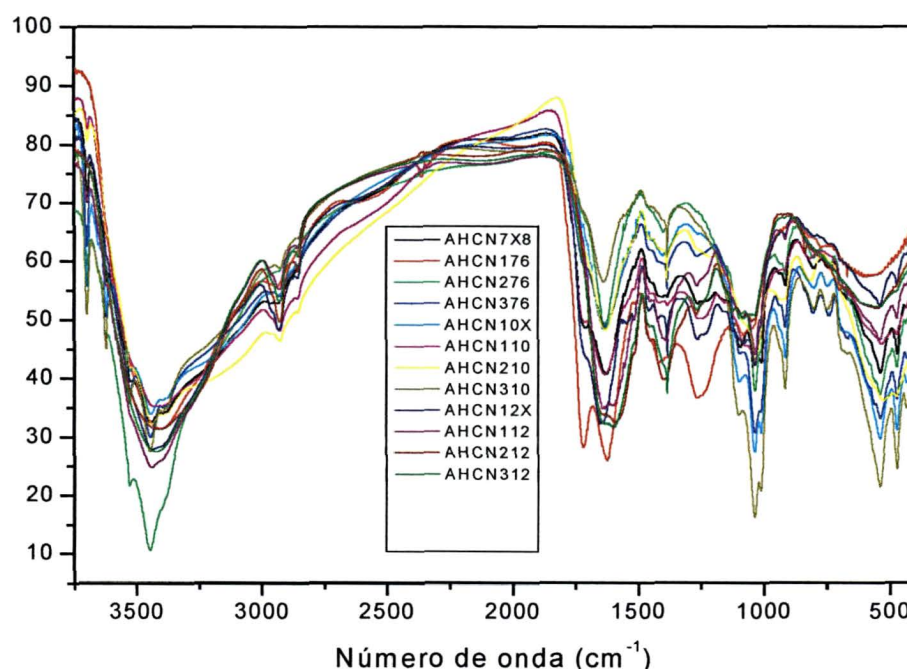
Figura 69: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos ácidos húmicos (AH) de campo nativo extraídos a pH 7,6; 10,6 e 12,6 e isolados utilizando-se resina XAD-8 e/ou liofilizados diretamente



4.2.1.4 AH de Campo Nativo - Análises Multivariadas

A Figura 70 a seguir mostra os espectros de FTIR dos AH de solo sob campo nativo extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6 respectivamente que foram utilizados na PCA.

Figura 70: Espectros de FTIR de AH na região de 3500 - 400 cm^{-1} , pré-processados com tratamento MSC, centrados na média e alisados em 13 pontos



Empregando-se a análise de componentes principais (PCA) nos dados de FTIR, observa-se nos “loadings” da Figura 71 que:

O primeiro “loading” apresenta bandas características de matéria orgânica correlacionadas negativamente com minerais ($1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), o que é uma característica dominante em espectros de solo;

A segunda CP apresenta correlação inversa entre a região de 1720 cm^{-1} ν (ROC=O) de ácidos carboxílicos ésteres ou vibrações ν (C=O) de cetonas (Silverstein, 1979) com a região de $1630\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$ de estiramento C=O de grupo amida – banda de amida I - C=C de aromático, C=N, absorção anti-simétrica de

C=O de COO^- e deformação angular de H_2O (Pain, 1996). A banda na região de 1630 cm^{-1} pode ser indicadora do teor de matéria orgânica, mas também está relacionada a material inorgânico, em função da correlação positiva entre esta banda e a região de $3300 - 3500\text{ cm}^{-1}$; na 2ª CP;

A terceira CP apresenta correlação negativa entre a banda na região de 1720 cm^{-1} com a região de $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ que pode ser atribuída ao estiramento $\nu(\text{C-O})$ de grupos COOH (Pain, 1996), provavelmente celulose e hemicelulose residual ou a impurezas de silicatos, estiramento $\nu(\text{Si-O})$ (Guimarães, 1997);

O gráfico dos “scores” (Figura 72) mostra que tanto a primeira como a segunda CP separa os AH extraídos a pH 12,6 (AHCN112, AHCN212 e AHCN312) dos demais, com exceção da amostra AHCN276, em que na primeira CP fica separada das demais extrações a pH 7,6 e 10,6. Também por EPR se observa que esta amostra AHCN276 apresenta sinal pouco intenso na região de RLO ($g = 2,00$) e também uma banda larga nesta mesma região devido a Fe^{3+} ($g = 2$). Esta amostra AHCN276 apresenta banda pouco intensa em 1720 cm^{-1} em relação à banda em 1630 cm^{-1} (COO^-), desta forma pode-se sugerir que os minerais estão ligados a estes grupos COO^- como já citado.

Figura 71: “Loadings” para a 1ª, 2ª e 3ª CP para os dados de FTIR dos AH, na região de $1900 - 400\text{ cm}^{-1}$

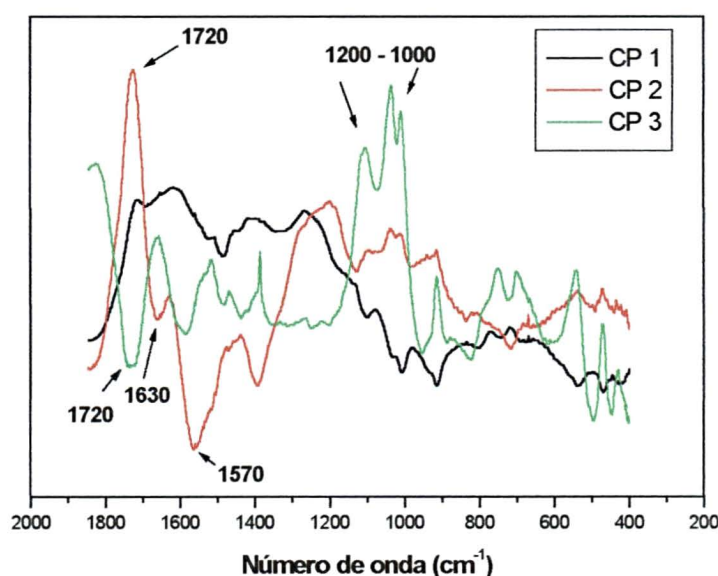
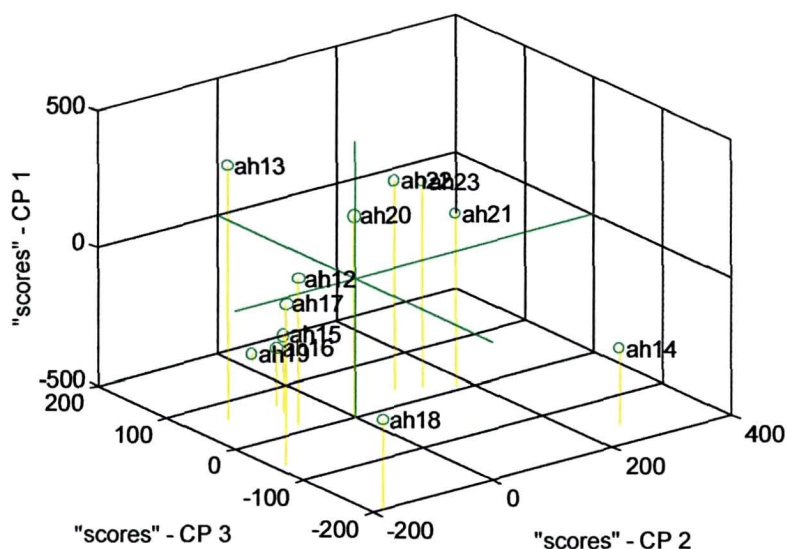


Figura 72: “Scores” para a 2ª CP versus a 3ª CP versus a 1ª CP para os dados de FTIR dos AH



4.2.1.5 AH de Campo Nativo - Conclusões Parciais

Verificaram-se diferenças estruturais nas amostras extraídas a diferentes pH (7,6, 10,6 e 12,6) utilizando-se as espectroscopias de EPR e FTIR. As amostras extraídas a pH 12,6, em especial a terceira extração a pH 12,6, apresentam maior teor de matéria orgânica, indicando assim a eficiência do processo seqüencial de extração em pH elevado. Isto foi observado tanto por espectroscopia de EPR quanto de FTIR. Também por estas espectroscopias verificou-se que comparando as amostras extraídas a mesmo pH 7,6 e 10,6, somente as amostras das primeiras extrações, AHCN176 e AHCN110, estavam menos “contaminadas” por estruturas inorgânicas. As amostras das segundas e terceiras extrações a pH 7,6 (AHCN276 e AHCN376) e a pH 10,6 (AHCN210 e AHCN310), apresentaram teores crescentes de argilas, como demonstrado pelas absorções de FTIR em 3700 cm^{-1} (estiramento de O-H livre de argilas) e 1100 cm^{-1} (estiramento de Si-O) e de EPR em $g = 4,3$ e $g \sim 2$ (Fe^{3+} em domínios diluídos e em domínios concentrados, respectivamente). Sugere-se que os íons Fe^{3+} estejam nas estruturas: linha em $g = 4,3$ – parcial MIS; e em $g \sim 2$ – total MIS, ou

fortemente ligados à matéria orgânica extraída, em “bolsos” hidrofóbicos, linha em $g = 4,3$ – parcial MOS. Este comportamento não é observado a pH 12,6 onde se verifica a melhor extração em termos de não “contaminação” por componentes inorgânicos. Por EPR, em 77 K identificou-se íon Cu^{2+} ligados a grupos oxigenados na amostra AHCN176 (primeira extração a pH 7,6) e ligados a grupos com nitrogênio como átomo doador na amostras AHCN276, AHCN10X e AHCN110. Os teores de radicais livres orgânicos das amostras estudadas caem com o avanço das extrações ($1^a > 2^a > 3^a$) em pH 7,6 e pH 10,6, e aumentam com o avanço das extrações em pH 12,6.

Pelos métodos multivariados sugere-se que as amostras mais puras, em termos de matéria orgânica, foram as obtidas em pH 12,6 em especial a terceira extração, indicando assim a eficiência do processo seqüencial de extração. Isto foi observado tanto por espectroscopia de EPR quanto de FTIR e UV-VIS. Sugere-se que a metodologia de extração usando soluções extratores a pH 12,6 foi mais eficiente que a pH 7,6 e 10,6 e que o uso da resina XAD-8, no isolamento de AH, separa eficientemente contaminantes inorgânicos destas frações.

4.2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO - COMPARATIVO DE AH E AF DE FLORESTA

4.2.2.1 AH e AF de Floresta

O objetivo do presente estudo foi o de isolar e caracterizar AH e AF extraídos de solo sob floresta utilizando metodologia de extração seqüencial já mencionada em “Materiais e Métodos”. O procedimento seqüencial da extração foi combinado com a utilização da resina XAD-8, que proporciona o fracionamento baseado em termos de diferenças das funcionalidades ácidas, de densidade de carga e de polaridade. Foram feitas 3 extrações a cada pH, e os AH e AF foram caracterizados por espectroscopia de EPR. Após, os dados foram normalizados pela soma das intensidades e cada intensidade do espectro foi dividida por esta soma, pré-processados com alisamento, centrados na média e tratados aplicando-se métodos multivariados (PCA). Neste momento, além de se estudar os AH e AF extraídos a diferentes pH, estuda-se também os AH isolados utilizando o procedimento da resina XAD-8 e, dentre estes, o material coletado da resina XAD-8 após esta ter sido dessalinizada com H₂O destilada antes de ser eluída ao inverso com NaOH.

A Tabela 33 a seguir mostra os códigos das amostras estudadas de AH e AF de solo sob floresta extraídos a diferentes pH e isoladas utilizando a resina XAD-8.

Tabela 33: AH e AF de solo sob floresta extraídos a diferentes pH e isolados utilizando a resina XAD-8.

Amostras	Extração
AFF176	Ácido fúlvico - floresta - 1ª extração a pH 7,6 - XAD 8
AFF17D	Ácido fúlvico - floresta - 1ª extração a pH 7,6 - dessalinização – XAD8
AFF237	Ácido fúlvico - floresta - 2ª + 3ª extração a pH 7,6 - XAD 8
AFF110	Ácido fúlvico - floresta - 1ª extração a pH 10,6 - XAD 8
AF110D	Ácido fúlvico - floresta - 1ª extração a pH 10,6 - dessalinização - XAD 8
AF2310	Ácido fúlvico - floresta - 2ª + 3ª extração a pH 10,6 – XAD 8
AF210D	Ácido fúlvico - floresta - 2ª + 3ª extração a pH 10,6 - dessalinização - XAD 8
AFF112	Ácido fúlvico - floresta - 1ª extração a pH 12,6 – XAD 8
AF112D	Ácido fúlvico - floresta - 1ª extração a pH 12,6 - dessalinização - XAD 8
AF2312	Ácido fúlvico – floresta – 2ª + 3ª extração a pH 12,6 - XAD 8
AHF2376	Ácido húmico – floresta – 2ª + 3ª extração a pH 7,6
AHF1106	Ácido húmico – floresta – 1ª extração a pH 10,6
AHF2310	Ácido húmico – floresta – 2ª + 3ª extração a pH 10,6
AHF10X8	Ácido húmico – floresta – 1ª + 2ª + 3ª extração a pH 10,6 – XAD 8
AHF10XD	Ácido húmico – floresta – 1ª + 2ª + 3ª extração a pH 10,6 – XAD 8 – dessalinização
AHF1126	Ácido húmico – floresta – 1ª extração a pH 12,6
AHF2312	Ácido húmico – floresta – 2ª + 3ª extração a pH 12,6
AHF12X8	Ácido húmico – floresta – 1ª + 2ª + 3ª extração a pH 12,6 – XAD 8
AHF12XD	Ácido húmico – floresta – 1ª + 2ª + 3ª extração a pH 12,6 – XAD 8 – dessalinização

4.2.2.2 AH e AF de Floresta - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

As Figuras 73 e 74 mostram os espectros de EPR 77 K para as amostras de AF e as Figuras 75 e 76 mostram os espectros de EPR em 77 K para as amostras de AH de solo sob Floresta extraídas a pH 7,6, 10,6 e 12,6 e isoladas utilizando a resina XAD-8.

Com relação aos AF tem-se que na amostra AFF176 verifica-se sinal intenso de Cu^{2+} , tanto para o espectro paralelo quanto perpendicular, sendo este sinal menos intenso na amostra AFF17D e AFF237. Este sinal tende a diminuir do pH 7,6 ao pH 10,6 de extração e não se vê o mesmo a pH 12,6 devido ao intenso sinal de Mn^{2+} .

Verifica-se nas amostras de AF extraídas a pH 10,6 (AFF110 E AFF2310) e na 1ª extração a pH 12,6 (AFF112) sinal bastante intenso de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ ($A = 86$

G), que pode ser melhor visualizada na figura X. Em função do intenso sinal de Mn^{2+} não se visualiza o sinal do RLO.

Os AF dessalinizados da resina XAD-8 a pH 10,6 não apresentam este sinal intenso de $Mn(H_2O)_6^{2+}$ sugerindo-se assim que este Mn^{2+} está ligado a estruturas orgânicas, e que este complexo AF- Mn^{2+} foi eficientemente isolados na resina XAD-8 (estruturas hidrófilas). Este AF, que foi coletado da resina via eluição inversa com NaOH apresentou estes sinais intensos de Mn^{2+} , enquanto que o material que foi dessalinizado (coletado com H_2O) da resina, não apresentou este sinal, sugerindo assim que este Mn^{2+} está ligado a estruturas hidrófilas.

A pH 12,6 observa-se este sinal de Mn^{2+} na 1ª extração, sendo que na amostras dessalinizada e na 2ª e 3ª extração, vê-se sinal intenso de Cu^{2+} (espectros paralelo e perpendicular). Cu^{2+} ($g_{||} = 2,250$; $A_{||} = 160$ G) ligado a oxigênios de grupos orgânicos.

Em todas as amostras de AF, em todos os pH, observa-se sinal de Fe^{3+} ($g = 4,3$), em domínios diluídos, ligado a estruturas orgânicas. Como já era esperado, este sinal é menos intenso nos AF extraídos a pH 12,6.

O sinal de radical livre orgânico (RLO) ($g = 2,0038$), de estruturas de o-semiquinonas, é intenso nos AF extraídos a pH 10,6. Não se pode fazer comentários com relação a este sinal a pH 12,6 em função do sinal de Mn^{2+} na mesma região.

Os AF extraídos em pH 10,6 e 12,6 apresentam sinais de $Mn(H_2O)_6^{2+}$ e Fe^{3+} ($g = 2$), em domínios concentrados, ligados a estruturas inorgânicas, bastante intensos, deturpando assim o sinal de RLO ($g = 2,0038$).

Figura 73: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AF de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8

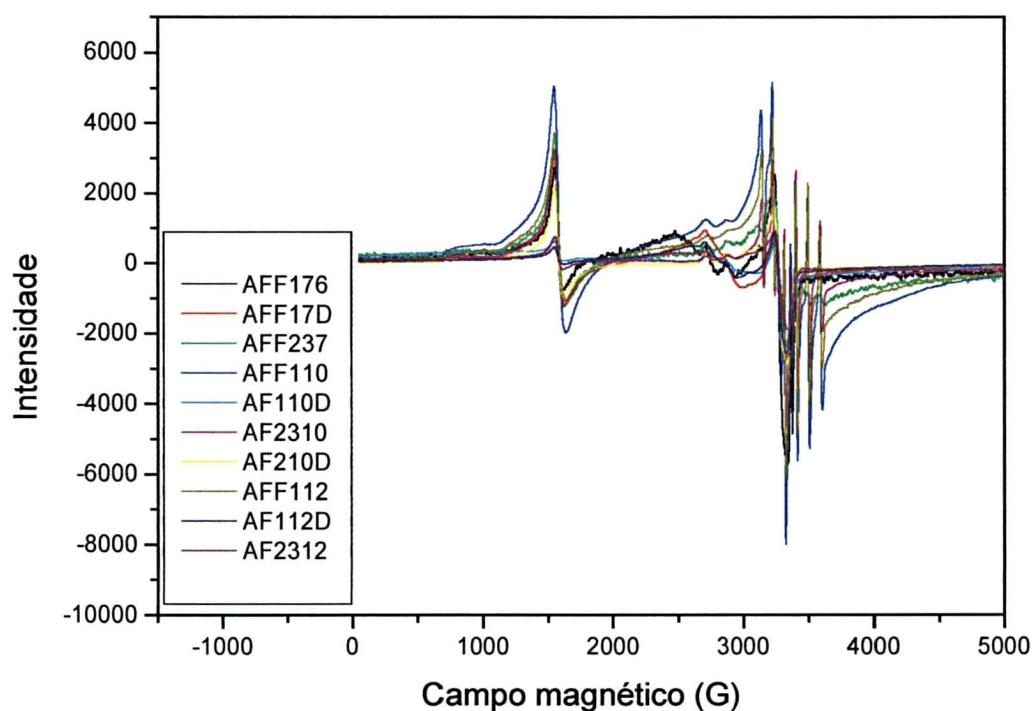
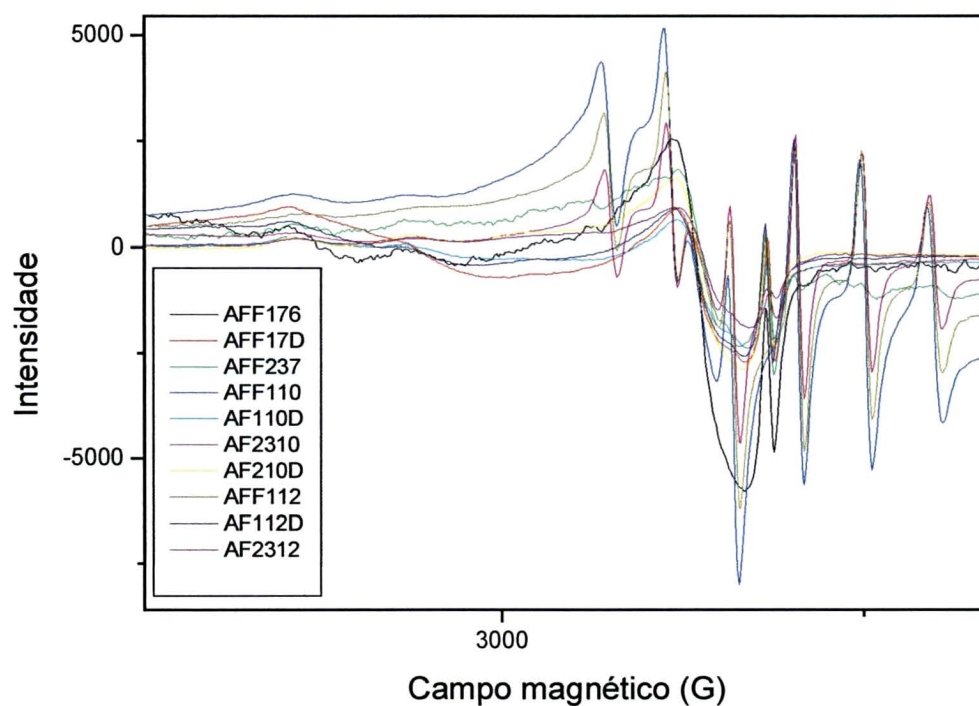


Figura 74: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AF de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8 - detalhe da região de RLO



Com relação ao AH extraído a pH 7,6 verifica-se uma banda larga na região de $g = 2$, referente a Fe^{3+} de domínios concentrados e em $g = 4,3$ referente a Fe^{3+} em domínios diluídos. Esta banda larga em $g = 2,0$ impede a visualização do sinal de RLO (Figura 73).

A pH 10,6 também se verificam sinais de Cu^{2+} , sendo que o mesmo tende a aumentar com a elevação do pH de extração de 10,6 a 12,6, sugerindo assim que este Cu^{2+} está fortemente ligado a material orgânico, neste caso, os AH, pois a pH 12,6 estes sinais ainda são observados.

A pH 12,6 tem-se sinal intenso de RLO ($g = 2,0038$). Observa-se que o sinal de RLO vai se intensificando da extração a pH 10,6 para a extração a pH 12,6, e praticamente inexistente, a pH 7,6, ou que este sinal está sobreposto pela banda larga em $g = 2,0$ referente a Fe^{3+} . A intensidade deste sinal de RLO é maior na extração a pH 12,6, seguidos dos AHF1016 e AHF12XD, sendo que nas amostras em que os AH foram isolados via XAD-8 (AHF10X8 e AHF12X8) este sinal é menos intenso.

Figura 75: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AH de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com e sem o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8

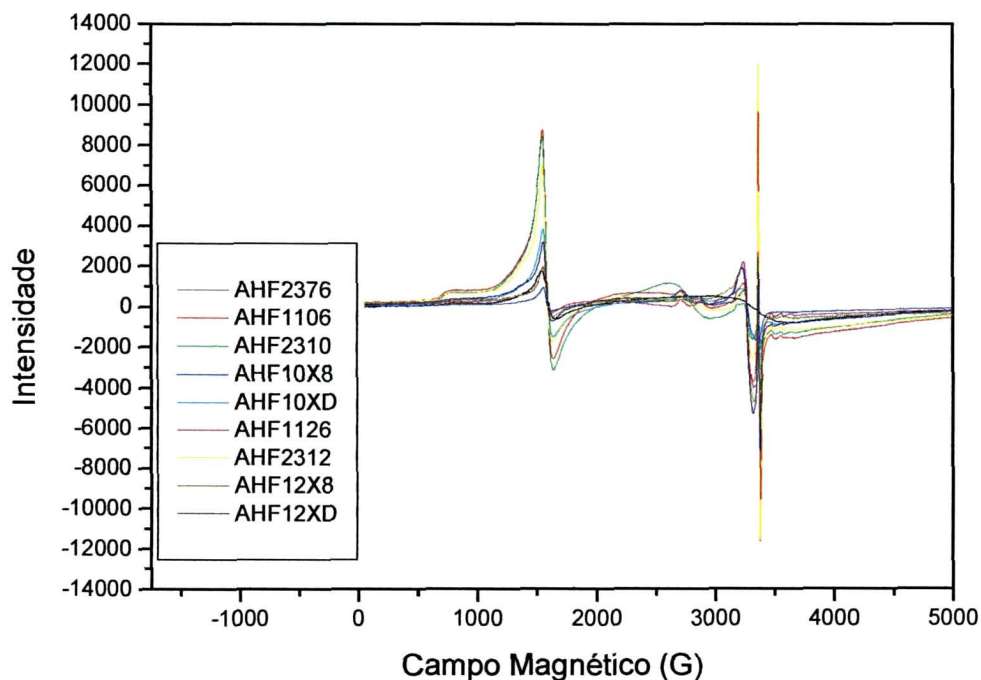
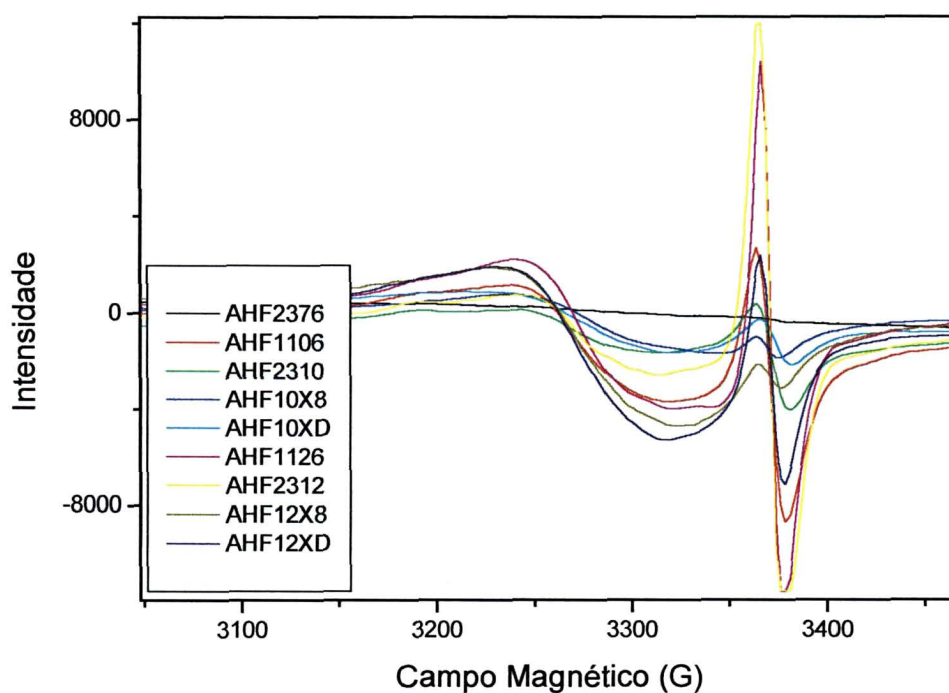


Figura 76: Espectros de EPR a 5000 G a 77 K de AH de Floresta extraídos a pH 7,6, 10,6 e 12,6, isolados com e sem o uso da resina XAD-8 e dessalinizados da resina XAD-8 – detalhe da região de RLO



No geral, verifica-se que a resina XAD-8 isola as estruturas orgânicas hidrofílicas, como esperado, mas carregada de íons metálicos, como Fe^{3+} e Mn^{2+} , o que é demonstrado pela primeira vez, neste trabalho, com a utilização de espectroscopia de EPR.

4.2.2.3. AH e AF de Floresta - Análises Multivariadas

Ao se comparar os AF e AH observam-se que nos AH o sinal de RLO é mais intenso e que nos AH não se tem o sinal intenso de Mn^{2+} verificado em alguns AF.

A Figura 77 mostra os "loadings" para a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª CP para os dados de EPR dos AF. A Figura 78 mostra os mesmos "loadings" expandidos na região de $g=2$ (RLO, Mn^{2+} e Cu^{2+}).

Nos 1º e 4º "loading" (Figura 77 e 78) há correlação positiva entre os sinais de Fe^{3+} ($g = 4,3$) e os sinais de Mn^{2+} . Esta correlação é verificada em função de que, apesar dos dois sinais estarem invertidos no eixo, os dois estão no mesmo sentido. Enquanto que no 2º e 3º "loading" há correlação negativa entre os sinais de Fe^{3+} e os sinais de Mn^{2+} . Isto sugere que os íons Fe^{3+} de domínios diluídos estão ligados a estruturas orgânicas, enquanto que os íons Mn^{2+} estão distribuídos entre estruturas orgânicas e inorgânicas. O 2º "loading" confirma mais claramente esta idéia, através da correlação direta entre o sinal de Fe^{3+} e o sinal de Cu^{2+} , um íon típico de estruturas orgânicas, e inversa ao sinal de Mn^{2+} , típico de estruturas inorgânicas.

Figura 77. “Loadings” para a 1ª, 2ª, 3ª, e 4ª CP para os dados de EPR dos AF de Floresta

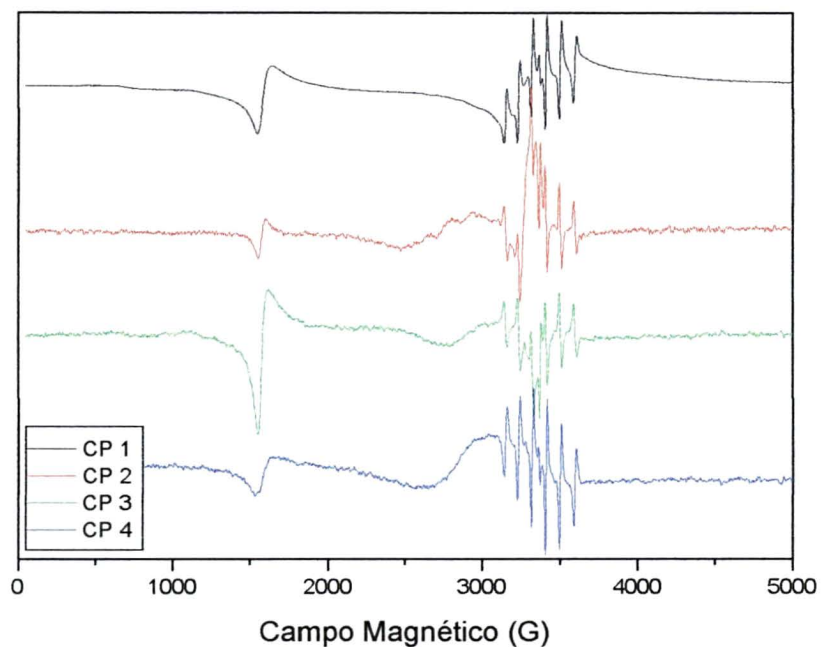
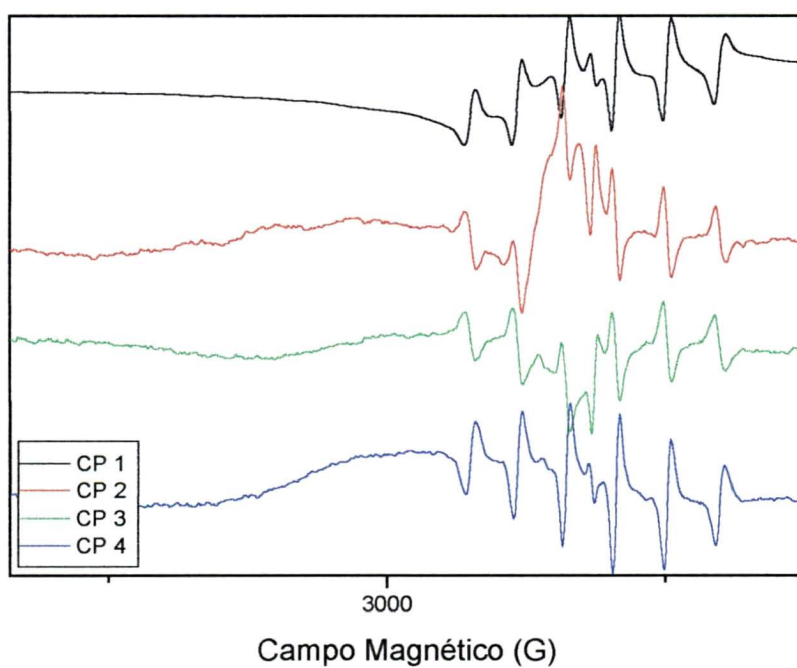


Figura 78: “Loadings” para a 1ª, 2ª, 3ª, e 4ª CP para os dados de EPR dos AF de Floresta – detalhe da região de RLO



A Figura 79 mostra os "scores" para a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª CP para os dados de EPR dos AF.

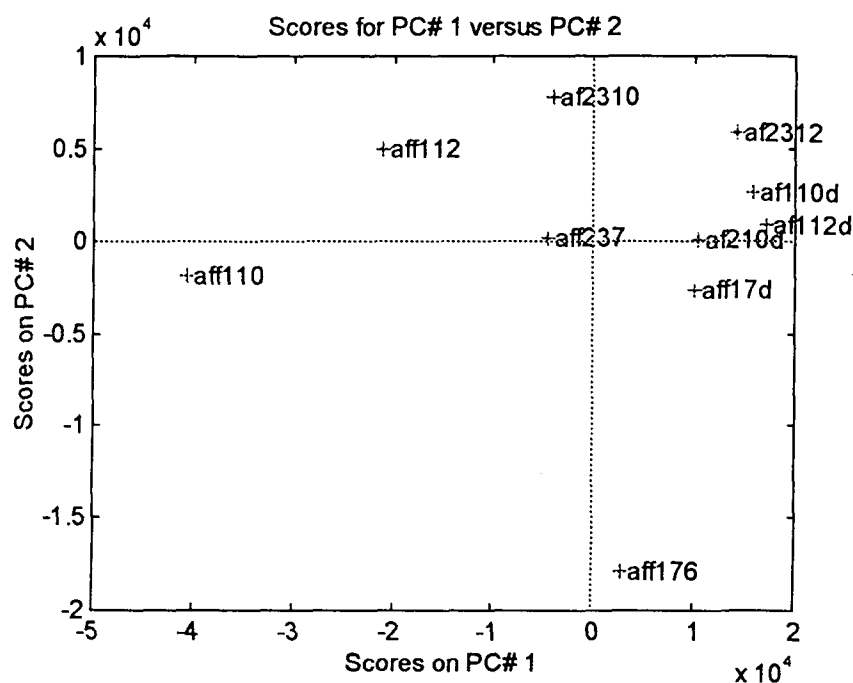
A 1ª componente principal (CP) explica ~ 75 % da variância total dos dados. A 1ª e a 2ª CP explicam ~ 86 % da variância total dos dados. A 1ª CP separa os AF extraídos a pH 7,6 dos demais extraídos a pH 10,6 e 12,6.

Observa-se que a 1ª CP separa os AF obtidos das 1as extrações a pH 10,6 e 12,6 das demais. A 2ª CP separa a amostra AFF176 (1ª extração a pH 7,6) das demais. Sugere-se que esta forma de agrupamento se deve em função dos pH extratores. O sinal de RLO é menor no AF176 e maior nos AF extraídos a pH 10,6 e 12,6. As demais amostras estão agrupadas em função do sinal de Mn^{2+} .

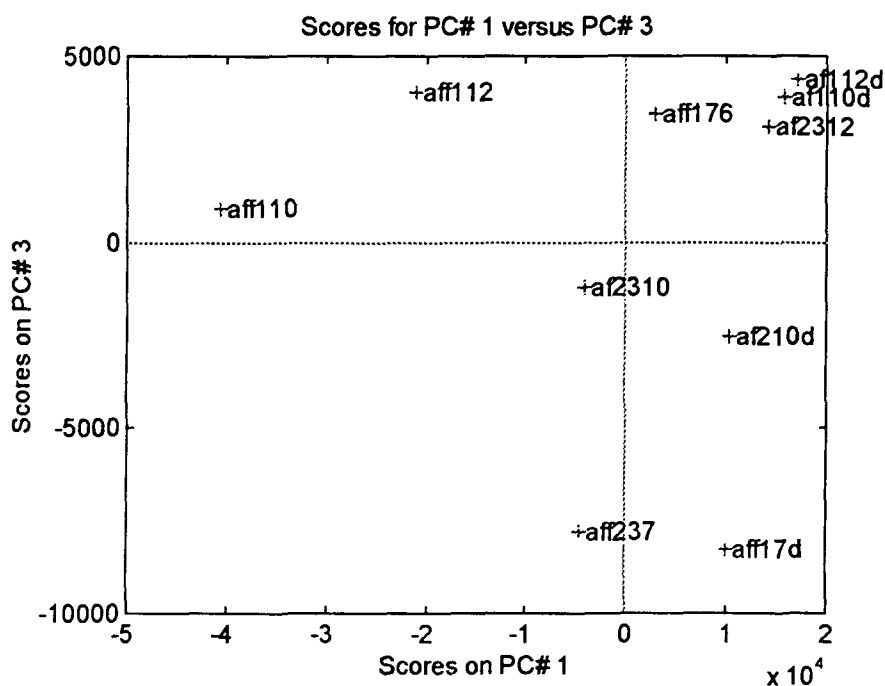
Outro fator que auxilia neste tipo de agrupamento é que nestas amostras, AFF176, AFF110 e AFF112 houve a adição de pirofosfato de sódio.

Figura 79: "Scores" para a 1ª CP versus a 2ª CP (A), para a 1ª CP e 3ª CP (B) e para a 2ª CP e 3ª CP (C) para os dados de EPR dos AF

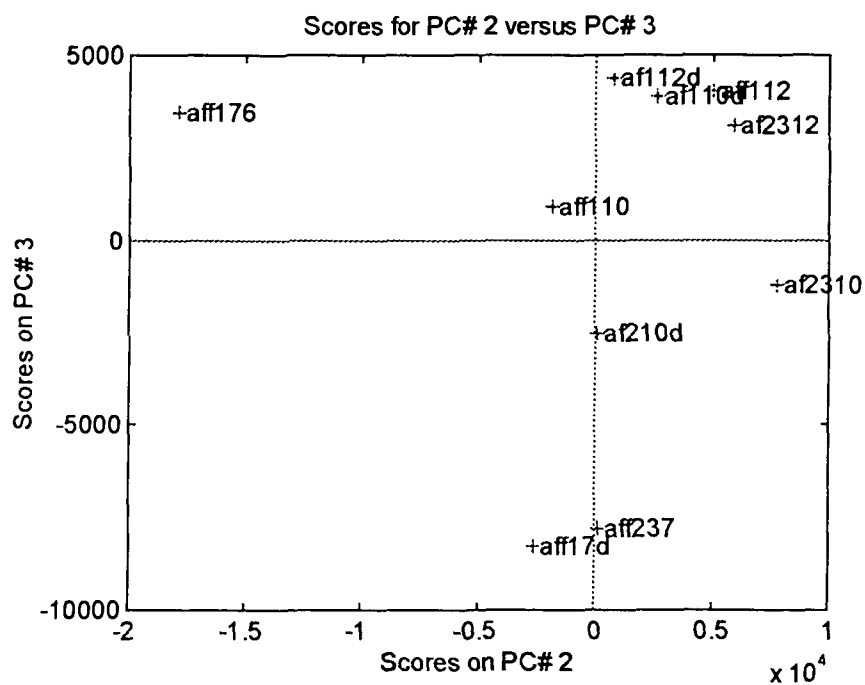
(A)



(B)



(C)



A Figura 80 mostra os “loadings” para a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a CP para os dados de EPR dos AH. A Figura 81 mostra os mesmos “loadings” expandidos na região de $g=2$ (RLO, Mn^{2+} e Cu^{2+}).

Também na PCA para os dados de AH têm-se que:

Os “loadings” das quatro primeiras CP contém as características espectrais relevantes para a série de dados, sinais típicos de Fe^{3+} em $g = 4,3$ e $g = 2$, sinais de Cu (Cu paralelo - Cu_{\parallel} com $g_{\parallel} = 2,250$ e $A_{\parallel} = 160$ e Cu perpendicular - Cu_{\perp} com $g_{\perp} = 2,05$) e RLO.

Os sinais de Fe^{3+} em $g = 4,3$ Cu^{2+} , paralelo e perpendicular, e de RLO estão correlacionados positivamente na 1ª CP.

Na 2ª CP há correlação positiva dos sinais de Cu^{2+} e RLO, ambos estão na matéria orgânica, e correlação negativa com o sinal de Fe^{3+} em domínios diluídos, sugerindo que parte dos íons Fe^{3+} , neste caso dos AH, está na matéria inorgânica.

Figura 80: “Loadings” para a 1ª, 2ª e 3ª CP para os dados de EPR dos AH de Floresta

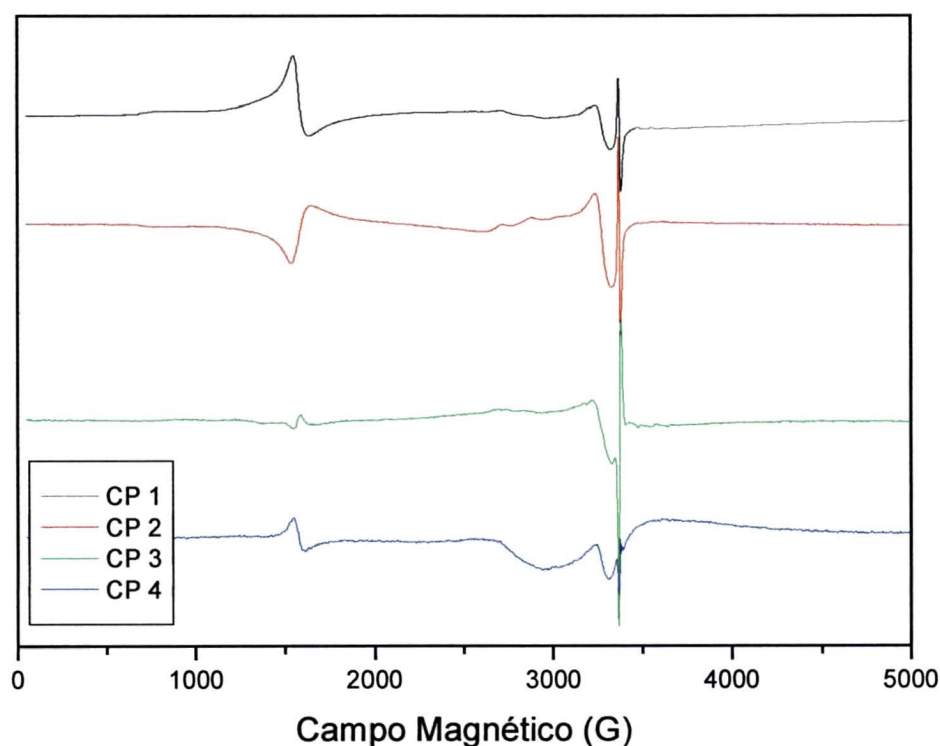
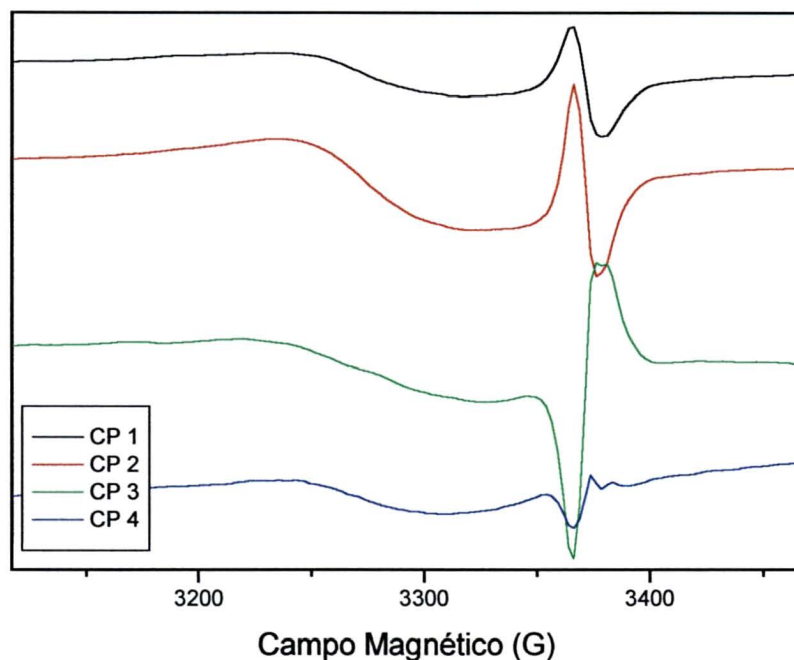


Figura 81: “Loadings” para a 1ª, 2ª 3ª e 4ª CP para os dados de EPR dos AH de Floresta – detalhe da região de RLO



A Figura 82 mostra os “scores” para a 1ª, 2ª e 3ª CP para os dados de EPR dos AH.

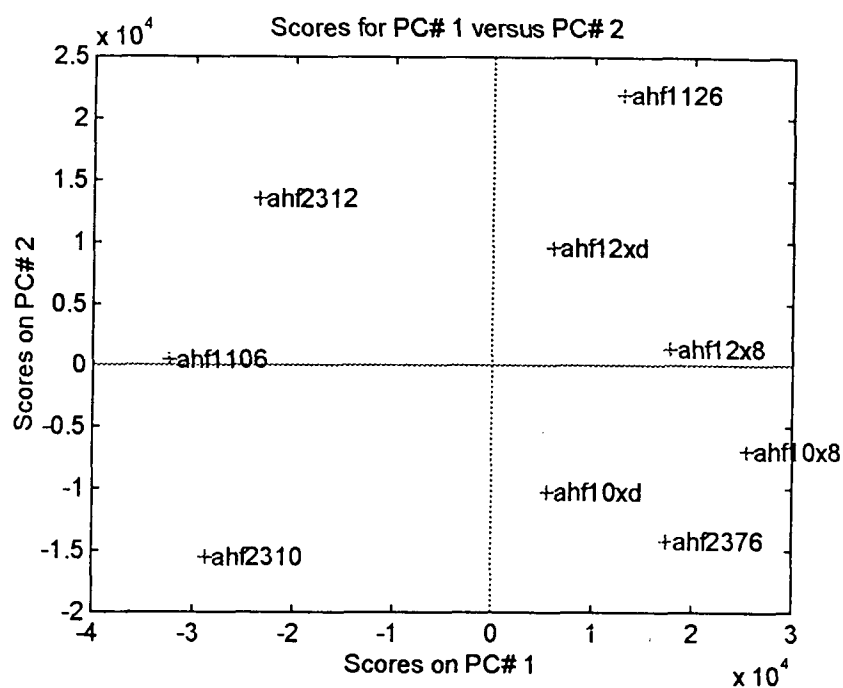
A 1ª componente principal (CP) não diferenciou as diferentes amostras.

A 2ª CP separou os AH extraídos a pH 12,6 dos demais.

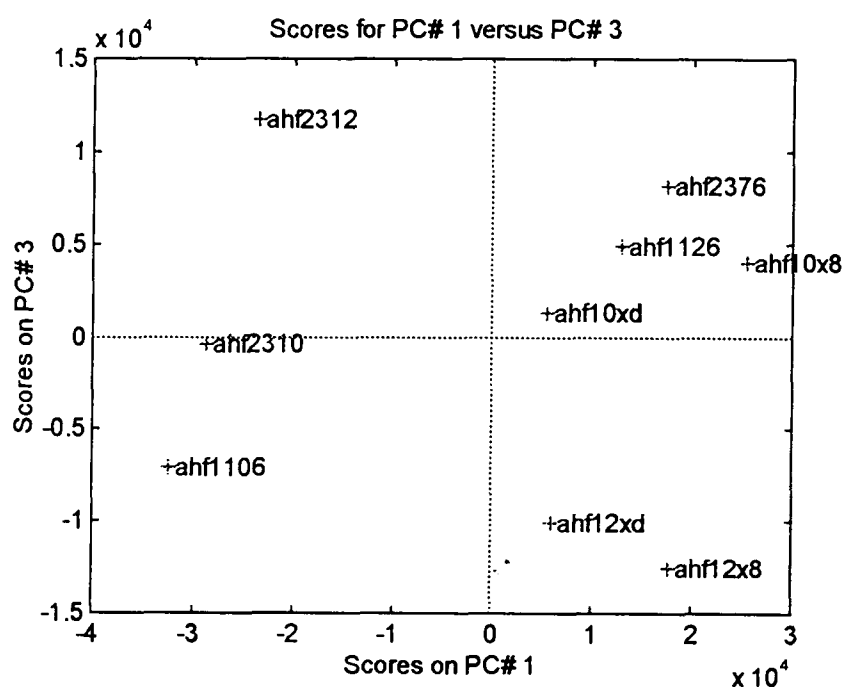
Na 3ª CP observa-se a separação da amostra AHF2312 da AHF12XD e AHF12X8, isto é, separa a amostra apenas extraída sem o uso da resina XAD-8 no isolamento do material das amostras isoladas utilizando-se a resina XAD-8.

Figura 82: “Scores” para a 1ª CP versus a 2ª CP (A), para a 1ª CP e 3ª CP (B) e para a 2ª CP versus a 3ª CP (C) para os dados de EPR dos AH

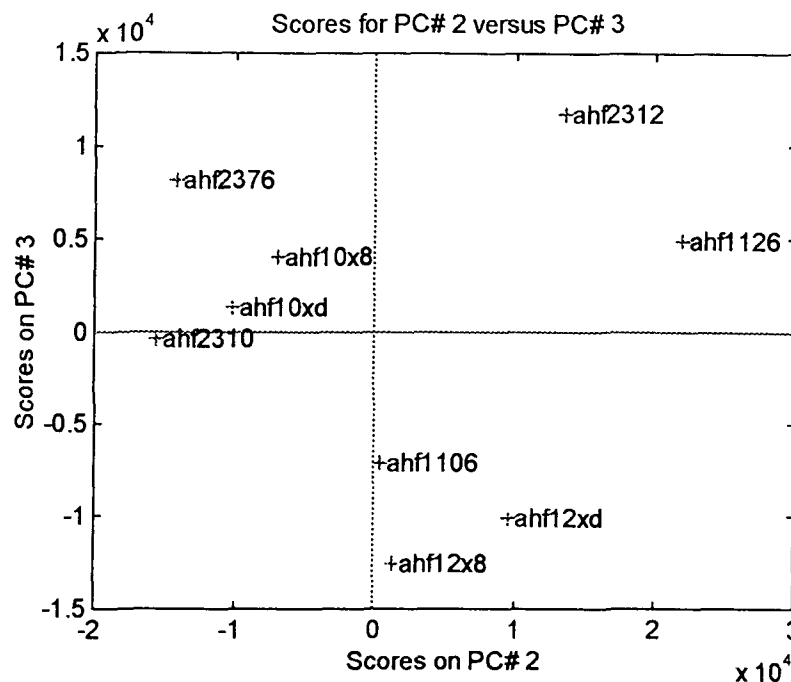
(A)



(B)



(C)



4.2.2.4. AH e AF de Floresta – Conclusões Parciais

Há diferenças entre AF e AH que são observadas através da presença e a intensidade dos sinais de Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e RLO.

Os AH apresentaram sinais de RLO mais intensos que os AF.

Os sinais de Mn^{2+} são mais intensos em AF, não aparecendo em AH. Sugere-se assim que este Mn^{2+} está ligado a estruturas facilmente extraíveis, pois os AF são solúveis em toda faixa de pH.

Os AH que não foram eluídos na XAD-8 apresentaram sinal mais intenso de RLO que os eluídos na mesma.

Os materiais dessalinizados das amostras de AH a pH 10,6 e 12,6 apresentaram sinal de Fe^{3+} em $g=4,3$ mais intenso que os AH eluídos da resina com NaOH.

Aplicando-se a análise de componentes principais aos dados de EPR de AH e AF observou-se através dos gráficos de "loadings" que os íons metálicos (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}), bem como o sinal de RLO, verificados nos espectros de EPR a

77 K, estão ligados tanto a estruturas orgânicas como inorgânicas presentes nos AF e AH extraídos do solo sob Floresta.

Aplicando-se a análise de componentes principais aos dados de EPR dos AF e AH extraídos de solo sob Floresta, observou-se através dos gráficos de “scores” a separação dos mesmos em função do pH da extração; a separação do AH extraído a pH 12,6 e liofilizado diretamente (AHF2312) das amostras AHF12X8 e AHF12XD (AH extraído a pH 12,6 e isolado utilizando a resina XAD-8 e o material dessalinizado da resina XAD-8).

Esta forma de interpretação dos dados é nova na área de substâncias húmicas e vêm a confirmar que os íons metálicos em questão estão ligados tanto a estruturas orgânicas quanto inorgânicas nos AH e AF estudados.

4.2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO - NOVA METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO DE SH DE SOLO - PLS APLICADO ÀS ANÁLISES DE DRIFT E EPR “VERSUS” NMR

Os espectros de DRIFT e EPR dos diferentes AH e AF HAF7 (ácido húmico de solo sob floresta extraído a pH 7,6), HAF12 (ácido húmico de solo sob floresta extraído a pH 12,6), FALT12 (ácido fúlvico de solo sob plantio direto extraído a pH 12,6), HALT12 (ácido húmico de solo sob plantio direto extraído a pH 12,6), HANF7 (ácido húmico de solo sob campo nativo extraído a pH 7,6), HANF12 (ácido húmico de solo sob campo nativo extraído a pH 12,6) são mostrados na Figura 83 e 84.

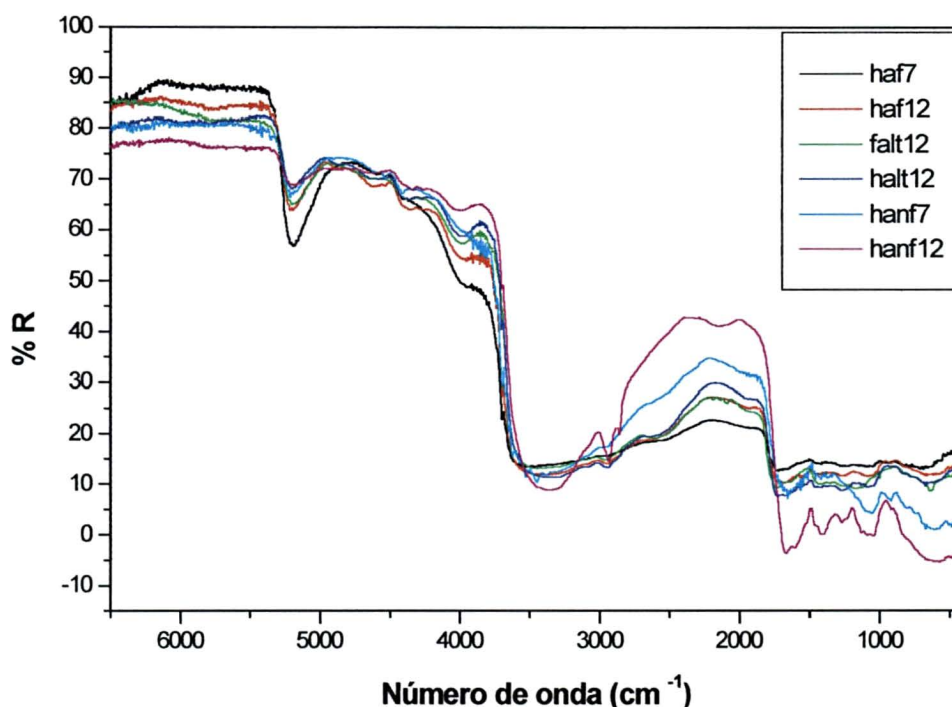
4.2.3.1 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) por Reflectância Difusa (DRIFT)

A interpretação dos espectros de DRIFT está de acordo com espectros de amostras de solo, húmus e AH previamente publicados (Mangrich, 2002). A região do infravermelho próximo (NIR) contém informações relacionadas a proporções relativas a ligações de C-H, N-H, O-H, C-O, presentes em moléculas orgânicas ou minerais associados ao material orgânico. Os espectros no infravermelho próximo apresentam bandas largas na região em $5300 - 5000 \text{ cm}^{-1}$, referentes ao segundo sobretom (3 v de -C=O de COOH), e/ou banda de combinação de O-H, $\nu + \delta$), região de 4610 cm^{-1} (3 v de C=C de aromáticos), 4370 cm^{-1} (3 δ de CH_2 e CH_3), 4000 cm^{-1} (2 v de CH_3) (Mangrich, 2002) (Figura 83).

Na região no infravermelho médio, os espectros apresentam bandas em 3695 cm^{-1} (ν O-H de argila ou OH de fenol, ambos sem ponte de H). A amostra HANF7 apresenta bandas em 3671 cm^{-1} , 3647 cm^{-1} , 3618 cm^{-1} , 3527 cm^{-1} e 3446 cm^{-1} todas referentes às vibrações de E-O-H de argilas. O estiramento NH de aminas ou amidas e OH de H_2O também podem contribuir para a absorbância

nesta região. O alargamento das bandas sugere multiplicidade destes tipos de ligações, com possíveis pontes de H, de diferentes grandezas (Figura 83).

Figura 83: Espectros no infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier (DRIFT) de AH e AF extraídos a pH 7,6 e pH 12,6, na região de $6500 - 400 \text{ cm}^{-1}$, pré-processados com alisamento, com correção do fator multiplicativo (MSC) e centrados na média



As vibrações de deformação angulares E-O-H também são verificadas em 800 cm^{-1} e 750 cm^{-1} , verificado na amostra HANF7, ($\text{pH} = 7,6$) o que é esperado nesta extração. O teor de minerais é maior quando comparado às extrações a pH 10,6 e 12,6.

As bandas em 2950 cm^{-1} (assimétrico) e 2850 cm^{-1} (simétrico) são devido a C-H de estruturas alifáticas. Estas bandas são mais intensas nos AH extraídos a pH 12,6.

As vibrações na região de 2500 cm^{-1} , 1725 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} atribuídas ao grupo COOH também são mais intensas nos AH extraídos a pH 12,6.

A vibração na região de 1720 cm^{-1} também pode ser atribuída a $\nu(\text{C=O})$ de cetonas (GUIMARÃES, 1997). A banda em 1720 cm^{-1} aparece em todas as amostras com exceção de HANF7. Na amostra HANF12, esta banda parece estar deslocada para a região de 1660 cm^{-1} ou então esta amostra apresenta apenas banda em 1660 cm^{-1} e não em 1720 cm^{-1} .

A banda larga em 1660 cm^{-1} também pode ser atribuída ao estiramento C=O de grupos amida (Rumpel, 2001). As bandas em 1600 cm^{-1} (em HANF7) e $1475 - 1450\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas à deformação angular de C-H alifáticos (Rumpel, 2001).

A vibração em 1625 cm^{-1} , atribuída a C=C de aromático e/ou a C=O de COO^- , possivelmente coordenado com metais, e a $\nu(\text{C=O})$ ligado a H ou $\nu(\text{C}=\text{O})$ de grupo amida – amida I, em FANF12 (Pereira, 2000).

As bandas em 2182 , 2130 e 2080 cm^{-1} , atribuídas a quartzo, aparecem apenas em FALT12 (Janick, 1995). Sugere-se que estes minerais se ligam mais às frações orgânicas de tamanhos moleculares menores, como no caso de AF. A banda larga na região de 2000 cm^{-1} é atribuída a bandas de combinação de carboidrato (2ν de C-O) (Janick, 1995) (Figura 83).

A banda larga em 1400 cm^{-1} , mais intensa em HANF, é atribuída à deformação angular de C-O-H e estiramento C-O de fenólicos e deformação C-C-H de CH_2 e CH_3 (Rumpel, 2001).

A vibração em 1260 cm^{-1} (atribuição ao estiramento - C-OH de alifáticos e, como já citado, deformação C-O-H de COOH -Rumpel, 2001), é mais intensa nos AH a pH 12.

Em $1100 - 1000\text{ cm}^{-1}$, a vibração é atribuída também ao $\nu(\text{C-O})$ de polissacarídeos (carboidratos) ou $\nu\text{ Si-O}$ (Pereira, 2000) (Figura 83).

4.2.3.2 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado as análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR das amostras de AH e AF (77 K) em 5000 G, a 77 K, são mostrados na Figura 84 a seguir bem como os valores de radical livre orgânico (RLO) são mostrados na Tabela 34 a seguir.

Figura 84: Espectros de EPR a 77 K (0 - 5000 G) de AH e AF extraídos a pH 7,6 e 12,6, pré-processados com normalização e centrados na média

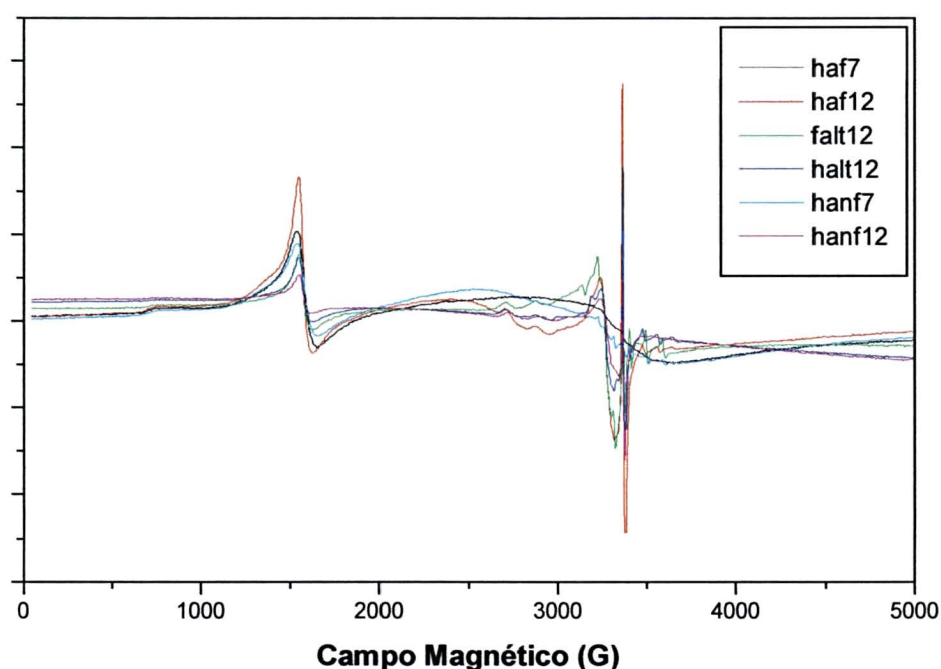


TABELA 34: Valores de RLO em número de spins g^{-1} dos AH e AF estudados

Amostra	RLO (spin/g)
HAF7	4.99 e+16
HAF12	5.22 e+16
FALT12	1.90 e+14
HALT12	6.00 e+16
HANF7	1.11 e+17*
HANF12	4.32 e+16

* O cálculo de RLO na amostra HANF7 está comprometido em função da presença de outros sinais (íons Fe^{3+} e Mn^{2+}) na mesma região de RLO.

Todos os espectros apresentaram linha fina na região de $g \approx 2,00$ típica de radical livre orgânico (RLO). As amostras HANF7 e FALT12 apresentaram sinal menos intenso nesta região quando comparado com os AH extraídos a pH12,6. Estes dados estão em conformidade com os teores de RLO (Tabela 34). A linha larga de absorção centrada em $g \approx 2,0$, corresponde à interações magnéticas de "exchange". Estas linhas largas ocorrem devido à presença de metais paramagnéticos como óxidos de ferro que absorvem na mesma região de campo magnético (Mangrich e colaboradores, 1998, Guimarães e colaboradores, 2001). Os espectros de EPR para os AH sugerem que a origem destas linhas largas seja devida à alta concentração de íons Fe^{3+} (típico de solos brasileiros) como óxidos de ferro (Guimarães e colaboradores, 2001). Desta forma, nas amostras HAF7, HANF7 e FALT12, que apresentaram sinal pouco intenso de RLO, pode-se sugerir que este sinal esteja "sob" o sinal intenso de Fe^{3+} em $g=2,0$ (linha larga nesta região). Por outro lado, íons paramagnéticos como Mn^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} diminuem a intensidade dos sinais de RLO (Novotny e Martin-Neto, 2002). A amostra FALT12 foi a que apresentou sinais mais evidentes do íon Mn^{2+} . Todas as amostras mostraram evidência de Fe^{3+} ($S = 5/2$) complexado em estrutura de coordenação rômica ($g = 4,3$) (Lombardi, 2001). Com exceção dos AH extraídos a pH 7,6, as demais amostras apresentaram sinal intenso de íons Cu^{2+} em simetria axial (Guimarães, 2001) (Figura 84).

4.2.3.3 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR "versus" NMR) - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C CPMAS NMR)

A Figura 85 a seguir mostra os espectros de ^{13}C CPMAS NMR para as amostras de AH e AF de solo sob Floresta, Plantio Direto e Campo Nativo extraídos a diferentes pH.

Com relação aos espectros de NMR de ^{13}C para as frações AH e AF isoladas a pH 7,6 e 12,6 de solo sob floresta, plantio direto e campo nativo, os

espectros mostram que há diferenças entre AH e AF isolados a pH 12,6, e diferenças entre os AH isolados a pH 7,6 e 12,6. Os espectros para AH extraídos de solo sob plantio direto e campo nativo apresentam ressonância considerável na região de aromáticos (110-142 ppm) e evidência de ressonância para a região de aromáticos-CO (140-160 ppm). Há ressonância nas regiões de:

(a) grupos metoxilas (55 ppm), em especial para AH extraído a pH 12,6 de solo sob floresta (HAF12) e plantio direto (HALT12) e no AH extraído a pH 7,6 de solo sob campo nativo (HANF7), provavelmente derivados de estruturas de ligninas;

(b) hidrocarbonetos alifáticos (0-40 ppm), com exceção de AF extraído a pH 12,6 de solo sob floresta (FALT);

(c) carboidratos (62-90 ppm), exceto para o AH extraído a pH 7,6 de floresta (HAF7);

(d) C anoméricos em especial nos AF e AH isolados de campo nativo e de plantio direto;

(e) grupos carboxilas (160-180 ppm), que são similares para todas as amostras de AF e AH.

Há sobreposição nas regiões de ressonância de aromáticos e C anoméricos nos AH de floresta.

A Tabela 35 a seguir mostra as áreas integradas dos espectros de ^{13}C CPMAS NMR de AF e AH extraídos de solo sob manejo de campo nativo, plantio direto e floresta.

Figura 85: Espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C CPMAS NMR) para os AH e AF extraídos de solos de Floresta, Plantio Direto e Campo Nativo a diferentes pH

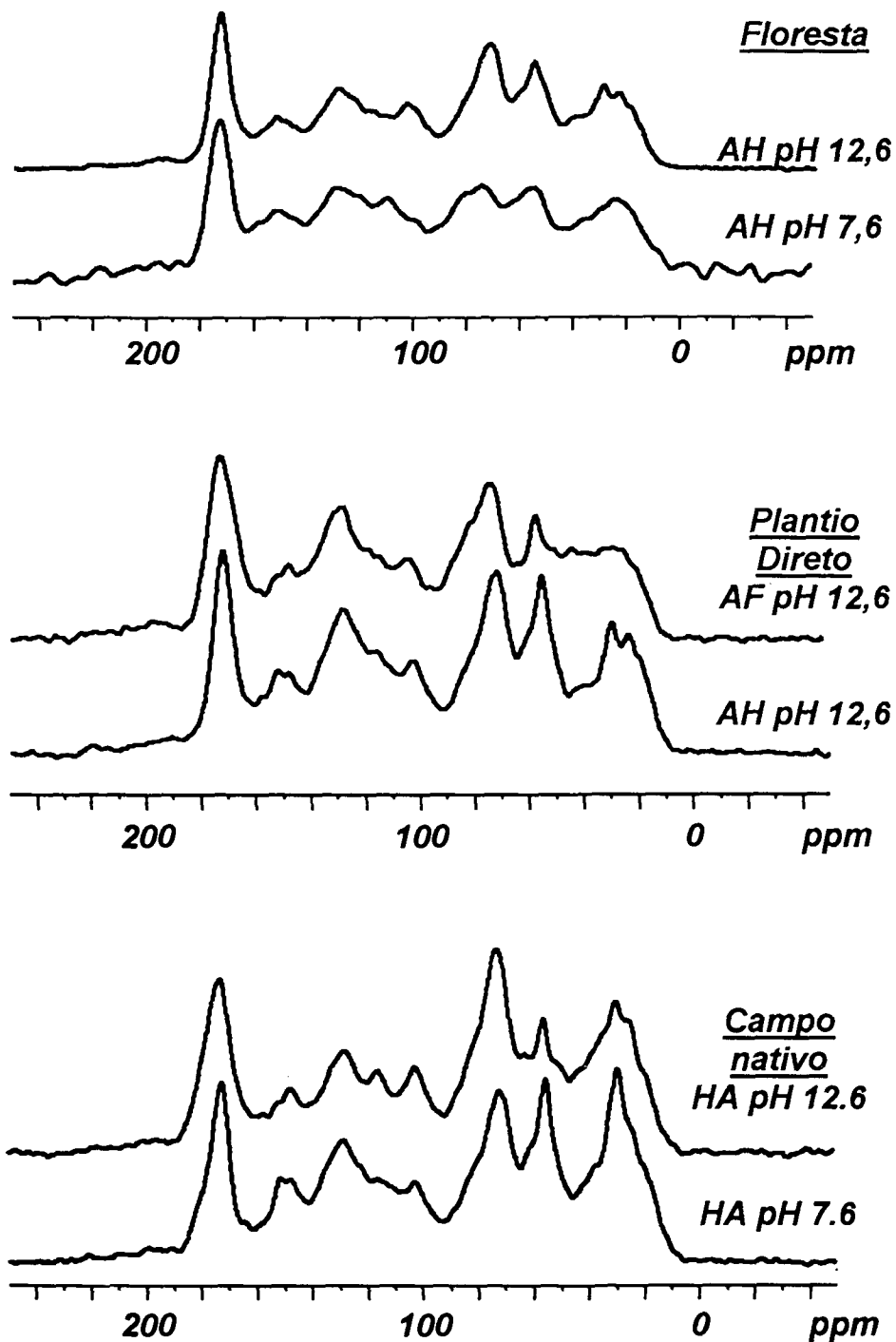


Tabela 35: Atribuições químicas do deslocamento (ppm) para as principais regiões dos espectros de ^{13}C CPMAS NMR e sua abundância relativa (%) para as amostras de AH e AF extraídas a pH 7,6 e 12,6

Amostras	%carbo nila 185- 220*	%COOH/ CON 155- 185	%aromáti cos -C-O 142-155	%aromá ticos 110-142	%grupos anomé ricos 90- 110	%carboi dratos 62-90	%meto xilas/Aa 44-62	%alifáti cos 0-44
HAF7	3,44	14,19	9,97	14,89	10,96	16,03	13,09	17,44
HAF12	2,74	14,70	7,47	17,89	7,53	18,95	13,49	17,22
FALT12	3,24	16,80	5,79	20,24	6,83	19,84	10,35	16,92
HALT12	2,60	13,29	7,54	20,69	7,20	17,48	13,80	17,40
HANF7	2,37	16,09	5,16	15,49	7,21	22,45	9,80	21,43
HANF12	2,74	12,02	8,09	17,60	6,38	18,35	12,78	22,05

Unidade: ppm

O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi aplicado como método de regressão e na avaliação das correlações entre os espectros de EPR e DRIFT (matriz X), com os dados de ^{13}C CPMAS NMR [(abundância relativa (%)) das atribuições químicas do deslocamento (ppm) para as regiões de ressonância de ^{13}C CPMAS NMR citadas na Tabela 35 (matriz Y)] nas amostras AH e AF extraídas a pH 7,6 e 12,6 sob diferentes manejos). O método PLS gera vetores "loadings" que explicam a variância qualitativa nos dados independentes, neste caso como os dados de ^{13}C CPMAS NMR se correlacionam, positivamente ou negativamente, com os dados espectrais (espectroscopias de EPR e DRIFT) (Rumpel, 2001). Qualitativamente, o método PLS também foi usado como método de regressão, para a construção de modelo de validação de uso de DRIFT e EPR na obtenção de determinação de grupos funcionais orgânicos determinados normalmente por NMR. No caso de solos brasileiros esta metodologia será importante, pois a análise de ^{13}C CPMAS NMR, para amostras sólidas, nem sempre é possível devido à excessiva quantidade de material magnético, principalmente Fe^{3+} . Os espectros que compuseram a matriz X de dados, tanto para os dados de EPR como de DRIFT, são das amostras descritas no início deste capítulo, HAF7, HAF12, FALT12, HALT12, HANF7 e HANF12.

4.2.3.4 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Análises Multivariadas

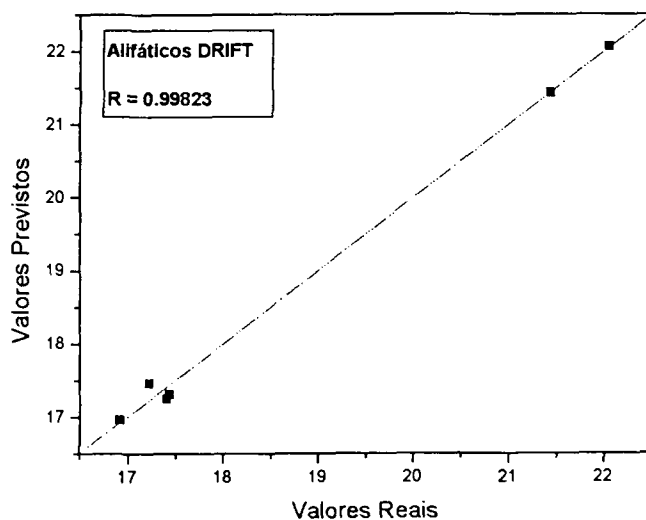
Com os dados das análises de ^{13}C NMR, foram feitos gráficos de correlações entre os valores reais de percentagens de grupos funcionais orgânicos determinados por espectroscopia de NMR de ^{13}C e os valores previstos através dos espectros de EPR e de DRIFT. A Tabela 36 mostra os coeficientes de correlações lineares desses gráficos para cada espectroscopia e cada grupo funcional orgânico das SH estudadas. Como observado na Tabela 36, as previsões entre o valor real e o valor estimado pelo modelo PLS das % dos grupamentos de NMR são boas. Sugerindo assim que a metodologia aqui proposta é coerente quando o objetivo é utilizar as espectroscopias de DRIFT e EPR como base na obtenção de dados de grupamentos funcionais orgânicos, como os determinados por NMR de ^{13}C . As correlações usando o modelo PLS com 3 VL, e espectros de DRIFT e EPR (matriz X) para os grupamentos aromáticos, alifáticos e COOH/CON são também verificados nas Figuras 86 e 87 a seguir.

Tabela 36: Correlação linear (R) entre os valores previstos dos grupamentos de ^{13}C NMR, pelo modelo PLS, com três variáveis latentes e os valores reais obtidos por ^{13}C NMR (% de grupamentos).

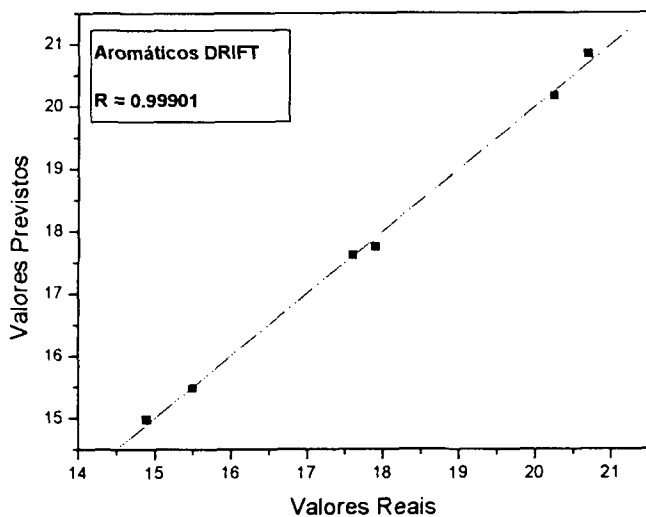
Abundância relativa (%)	EPR (R)	DRIFT (R)
% alifáticos (0-44ppm)	0.8918	0.9982
% metoxilas/Aa (44-62ppm)	0.9978	0.9652
% carboidratos (62-90ppm)	0.9926	0.9784
% grupos anoméricos (90-110ppm)	0.9963	0.9676
% Aromáticos (110-142ppm)	0.9975	0.9990
% Aromático C-O (142-155) ppm	0.9865	0.9630
% -COOH/CON (155-185ppm)	0.9969	0.9570
% carbonilas (185-220ppm)	0.9856	0.9827

Figura 86: Correlação linear (R) entre os valores previstos dos grupamentos de ^{13}C NMR, pelo modelo PLS (matriz X – DRIFT) , com três variáveis latentes e os valores reais obtidos por ^{13}C NMR (% de grupamentos alifáticos - A, aromáticos - B e COOH/CON - C)

(A)



(B)



(C)

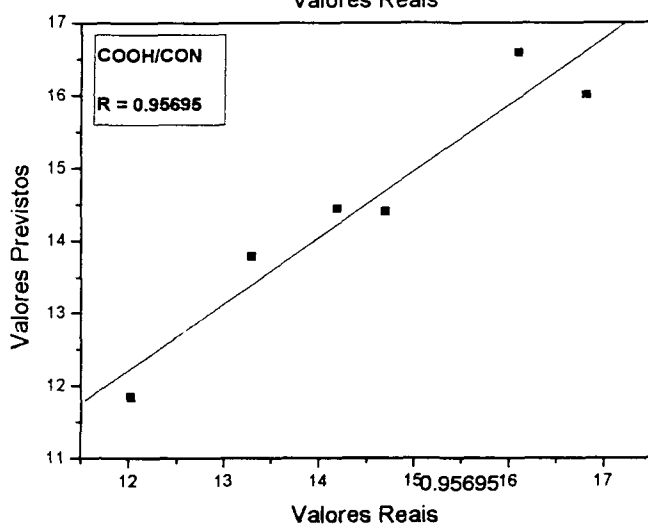
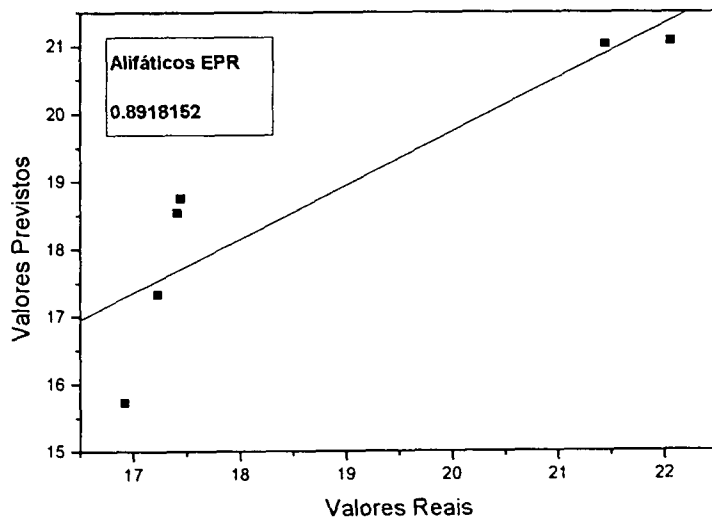
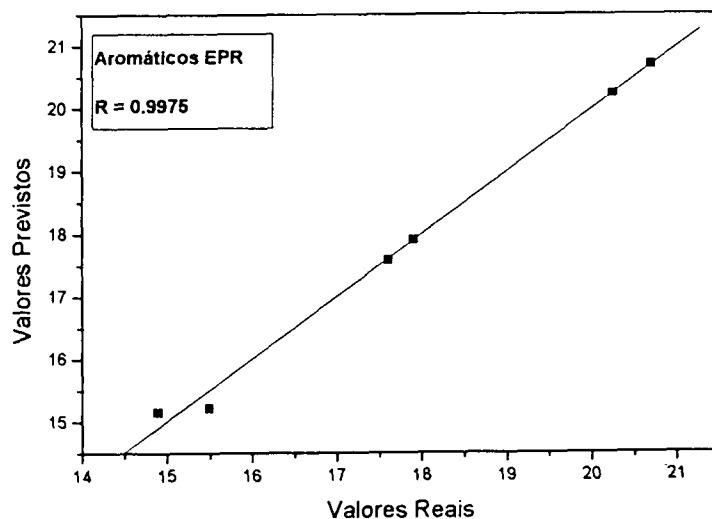


Figura 87: Correlação linear (R) entre os valores previstos dos grupamentos de ^{13}C NMR, pelo modelo PLS (matriz X – EPR), com três variáveis latentes e os valores reais obtidos por ^{13}C NMR (% de grupamentos alifáticos - A, aromáticos – B e COOH/CON - C)

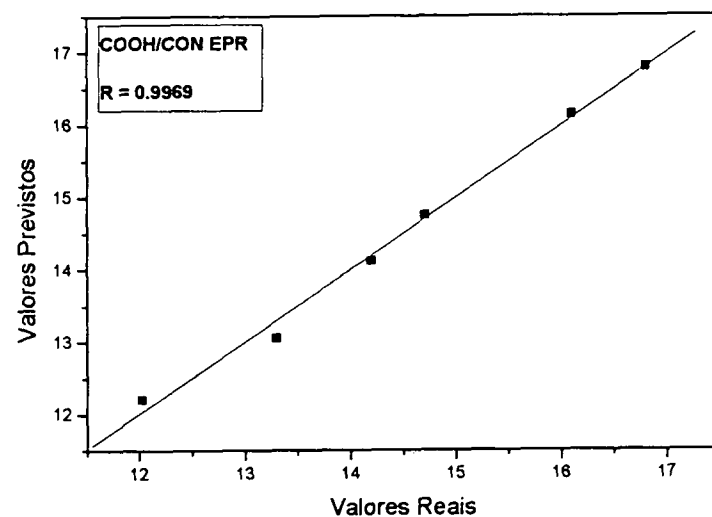
(A)



(B)



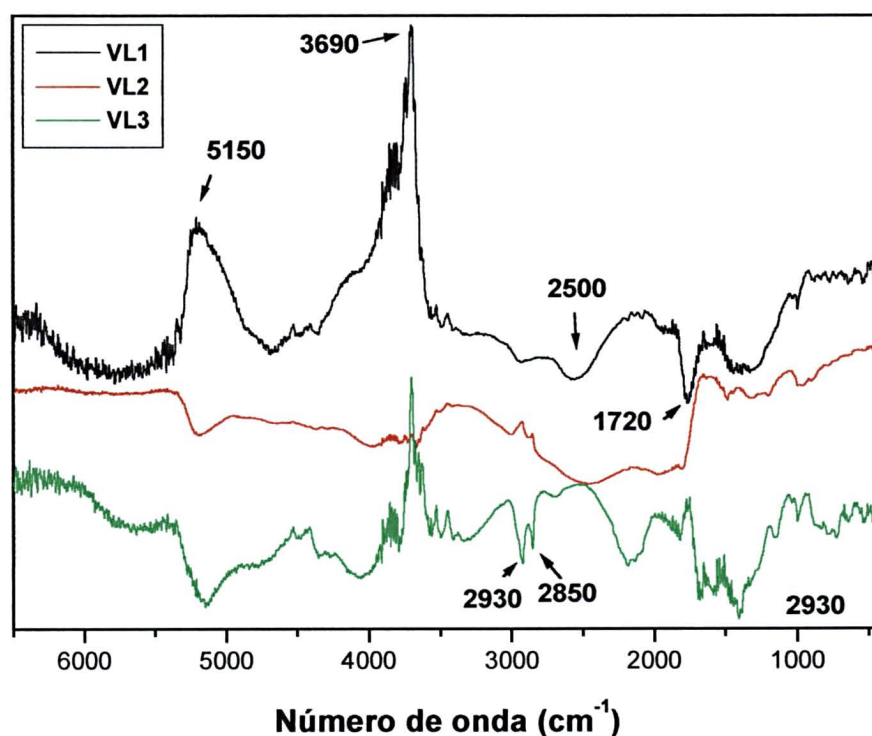
(C)



Em razão da alta correlação obtida, pode-se sugerir o uso das espectroscopias de EPR e/ou DRIFT na obtenção de dados de ^{13}C NMR na falta deste equipamento, ou na impossibilidade de obtenção dos espectros.

A Figura 88 a seguir mostra os três primeiros “loadings”, obtidos pelo modelo PLS, utilizando os espectros de DRIFT e os dados dos grupamentos aromáticos de NMR.

Figura 88: “Loadings” da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL), para o modelo PLS, dos dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos aromáticos nos espectros de ^{13}C NMR]] e espectros de DRIFT das amostras de ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) extraídos de solos sob diferentes manejos



Regiões importantes, que se correlacionam mais intensamente, com este grupamento são: 5150 cm^{-1} devido a $\nu + \delta$ de OH, 3 ν de $-\text{C}=\text{O}$ de COOH (Mangrich, 2002), ν de CH alifáticos em 2850 - 2920 cm^{-1} (apenas na 3ª VL), 2 ν

de C-O de COOH (2 X 1250 cm^{-1}) em 2500 cm^{-1} , ν de C=O de COOH em 1750 cm^{-1} .

O "loading" da 1ª VL contribui com 78% da variância de Y (^{13}C NMR) e as maiores correlações se devem às bandas nas regiões de 5150 cm^{-1} e região de 4000 – 3500 cm^{-1} , seguida das bandas em 2500 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} . Na 1ª VL se observa correlação positiva entre os grupamentos com as bandas na região de 2500 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} devida a grupos carboxílicos. Há correlação negativa de grupos aromáticos com as bandas em: 5150 cm^{-1} devido a $\nu + \delta$ de O-H e/ou 3 ν de C=O de COOH, 3697 cm^{-1} devido a ν de OH livre de ligações de H de argilas (principalmente) e 2190 a 2090 cm^{-1} referentes a absorção de Si-O (2 ν) de quartzo. Estas correlações negativas entre grupos aromáticos e regiões de argilas e quartzo sugerem que não há correlação positiva entre grupos aromáticos e materiais inorgânicos nas amostras estudadas. Isto está de acordo com os dados do PLS (EPR X NMR) onde há correlação negativa entre íons Fe^{3+} em domínios diluídos ($g = 4,3$) e estruturas aromáticas determinadas por espectroscopia de NMR.

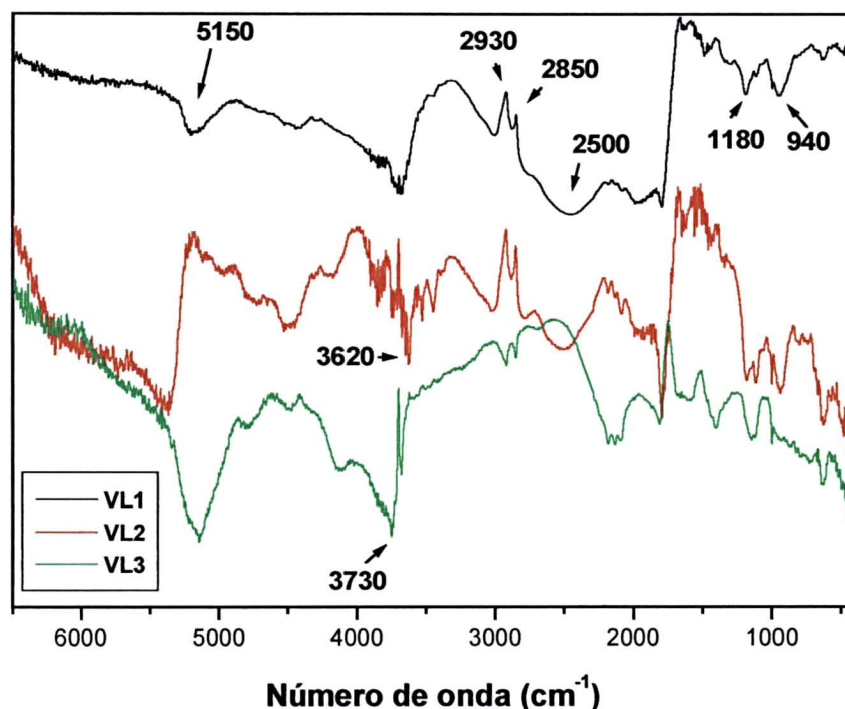
Na 2ª VL há correlação positiva com as bandas em 5150 cm^{-1} (que também é observado na 3ª VL), com as bandas de COOH em 2500 cm^{-1} e em 1250 cm^{-1} . Isto indica que parte da absorção em 5150 cm^{-1} agora é devida a 3 ν de C=O de COOH. Nesta 2ª VL há correlação negativa com as bandas em 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (CH_3/CH_2 – alifáticos) e 1630 cm^{-1} .

A 3ª VL contribui com apenas 2,5 % da variância em X e 0,8 % em Y e há correlação positiva entre a banda em 5150 cm^{-1} e a banda larga entre 3000 e 3500 cm^{-1} , sugerindo novamente que a banda em NIR é, em parte, devida a $\nu + \delta$ de OH de fenóis.

Conclui-se desta análise que grande parte dos grupos carboxílicos estão em estruturas aromáticas, que carregam, também grupos OH fenólicos.

A Figura 89 a seguir mostra os três primeiros "loadings" obtidos pelo modelo PLS, utilizando os espectros de DRIFT e os dados dos grupamentos COOH/CON de ^{13}C NMR.

Figura 89: “Loadings” da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos COOH/CON nos espectros de ^{13}C NMR]] e os espectros de DRIFT dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solos sob diferentes manejos



Regiões importantes, que se correlacionam mais intensamente, com este grupamento são: 5150 cm^{-1} , argilas $4000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, $4500\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, CH_3/CH_2 de estruturas alifáticos, 2500 cm^{-1} , quartzo (2190 cm^{-1} a 2090 cm^{-1}), $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$, 1000 cm^{-1} .

O “loading” da 1ª VL contribui com 87% das informações de X (DRIFT) e a 2ª VL contribui com 61% da variância de Y (NMR).

As maiores correlações entre grupos COOH/CON e os dados de DRIFT se devem às bandas nas regiões de 1730 cm^{-1} , para a 1ª VL e às bandas em 5150 cm^{-1} , $4000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ (argilas), 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (alifáticos) e 1730 cm^{-1} (COOH) para a 2ª VL, respectivamente.

Aqui também a 1ª e a 2ª VL são as mais importantes. Na 1ª VL há correlação positiva entre os grupamentos COOH/CON com as bandas na região

de 5150 cm^{-1} , $3720 - 3650\text{ cm}^{-1}$, 2500 cm^{-1} , 1980 cm^{-1} , 1800 cm^{-1} , 1180 cm^{-1} e 943 cm^{-1} . Nesta mesma 1ª VL há correlação negativa com as bandas em 2930 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (C-H de alifáticos) e 1650 cm^{-1} (C=O de COO^-). Sugere-se assim que os grupos COOH/CON estão em estruturas aromáticas e não em alifáticas.

Na 2ª VL há correlação positiva com as bandas em 4490 cm^{-1} , 3620 cm^{-1} , 2500 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} ; e correlação negativa com as bandas em 5150 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (CH_3/CH_2 alifáticos), região de quartzo e 1670 cm^{-1} .

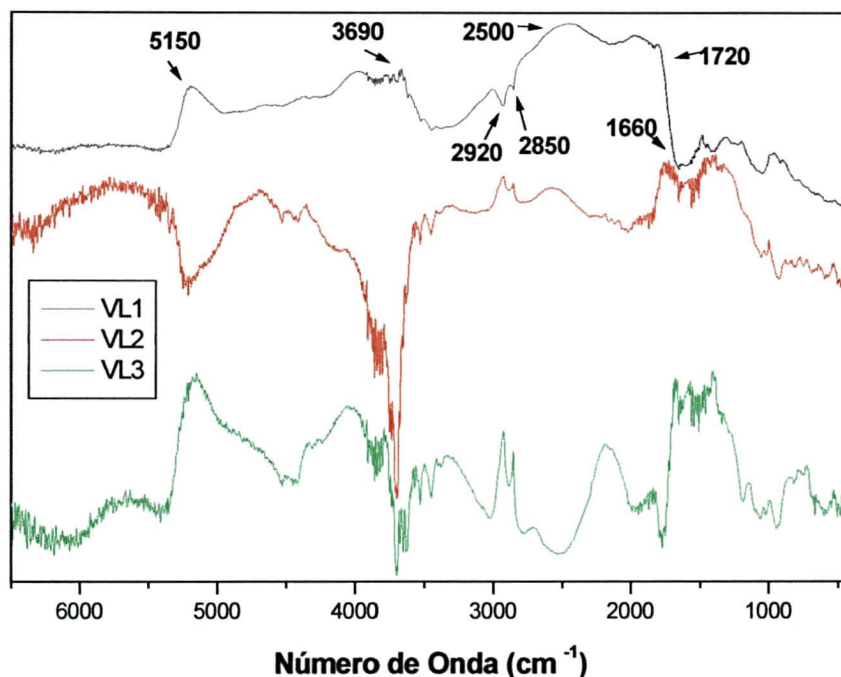
Na 3ª VL há correlação positiva com as bandas em 5150 cm^{-1} , 3730 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (alifáticos), região de quartzo, 1800 cm^{-1} e 1385 cm^{-1} . Na 1ª e na 2ª VL há correlação positiva com 1780 cm^{-1} e negativa com 1650 cm^{-1} .

Na região de 1720 cm^{-1} se observa correlação positiva com grupos COOH e, na região de 1660 cm^{-1} , correlação negativa com grupos COO^- (Figura 89).

A Figura 90 a seguir mostra os três primeiros "loadings" obtidos pelo modelo PLS, utilizando os espectros de DRIFT e os dados dos grupamentos alifáticos de NMR.

A 1ª VL, explica cerca de 90 % da variância da matriz X (espectros de DRIFT) e ~ 80 % da variância da matriz Y (espectros de NMR de ^{13}C). Verifica-se correlação inversa entre as absorções em 5150 cm^{-1} ($\nu + \delta$ de OH, 3 ν de C=O de COOH), em 2500 cm^{-1} (2 ν de C-O de COOH (2 X 1250 cm^{-1}), em 1750 cm^{-1} (ν de C=O de COOH) e ν de CH alifáticos em $2850 - 2930\text{ cm}^{-1}$, que, como se esperaria, está em correlação positiva com a variável Y (absorção de grupos alifáticos em NMR de ^{13}C).

Figura 90: “Loadings” da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos alifáticos nos espectros de ^{13}C NMR]] e os espectros de DRIFT dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solos sob diferentes manejos



Nas 2ª e 3ª VL, de menores importâncias, há correlações negativas entre as variáveis X (2920 e 2850 cm^{-1} , para ν de CH de alifáticos) e a variável Y (absorção de NMR de ^{13}C para alifáticos). Isto sugere modificações de região de absorção de alifáticos em NMR, muito mais sensível a grupos vizinhos, que as absorções por DRIFT. Nas três VL há correlações inversas entre as absorções para ν de CH alifáticos e as de ν para estruturas inorgânicas (3700 a 3500 cm^{-1} , ν OH, 2 ν de Si-O, em torno de 2000 cm^{-1} e ν de Si-O, em torno de 1100 cm^{-1}). Estas observações sugerem pouca interação entre estruturas alifáticas e estruturas inorgânicas nos solos estudados (Figura 90).

O mesmo tipo de análise aqui apresentada para grupos aromáticos, COOH/CON e grupos alifáticos, por DRIFT e NMR de ^{13}C , foram feitas para grupos metoxilas, carboidratos, carbonos anoméricos, aromáticos-CO, grupos

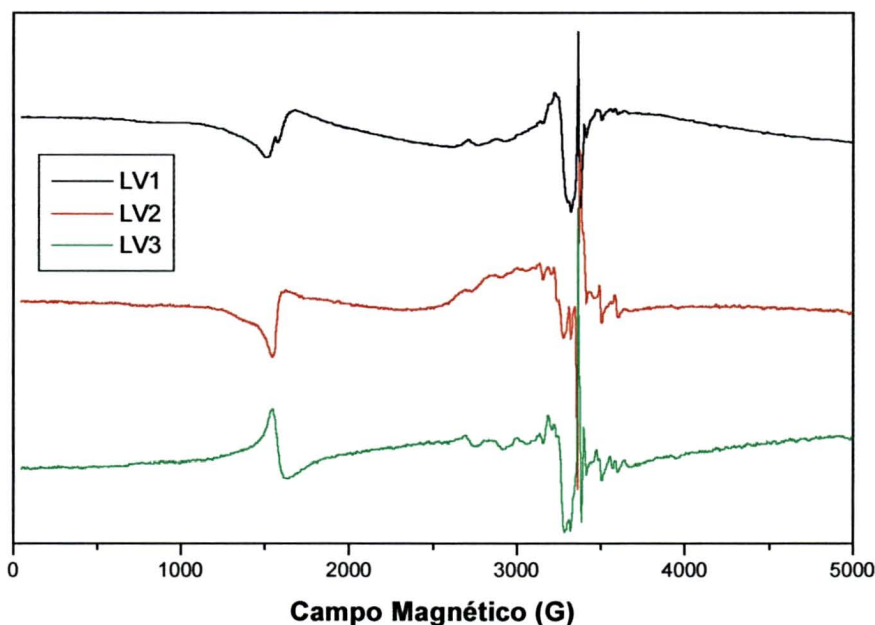
carboxílicos/amidas e carbonilas. Todos os grupos funcionais foram considerados na validação do método, conforme apresentado na Tabela dos coeficientes de correlações lineares, para as espectroscopias de DRIFT e EPR (Tabela 36).

As Figuras 91, 92 e 93 a seguir descrevem os três primeiros “loadings” para os espectros de EPR e para os dados dos grupamentos medidos pela espectroscopia de ^{13}C NMR de NMR.

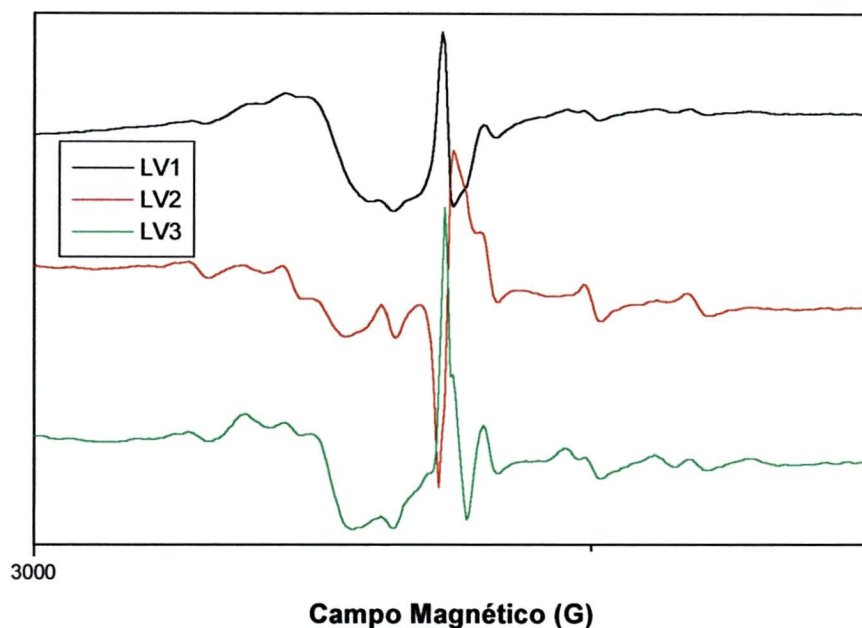
Nestas correlações entre percentagens de grupos funcionais orgânicos determinados nos espectros de NMR (matriz Y) e as intensidades dos espectros de EPR (matriz X), as correlações mais importantes se devem às intensidades nas regiões de Fe^{3+} em domínios diluídos ($g = 4,3; 9,0$), ligado a estruturas orgânicas, Fe^{3+} em domínios concentrados ($g = 2,0$), Cu^{2+} ligado a grupos oxigenados e nitrogenados, ambos orgânicos, e radical livre orgânico (RLO) em $g = 2,0038$, de estruturas de o – semiquinonas (Figura 25, 26 e 27). Estes sinais são característicos das interações inorgânicos – orgânicos de SH de solo.

Figura 91: “Loadings” da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos aromáticos nos espectros de ^{13}C NMR]] e espectros de EPR (0 - 5000 G – A e ~ 2000 – 3500 G - B) dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solo sob diferentes manejos

(A)



(B)



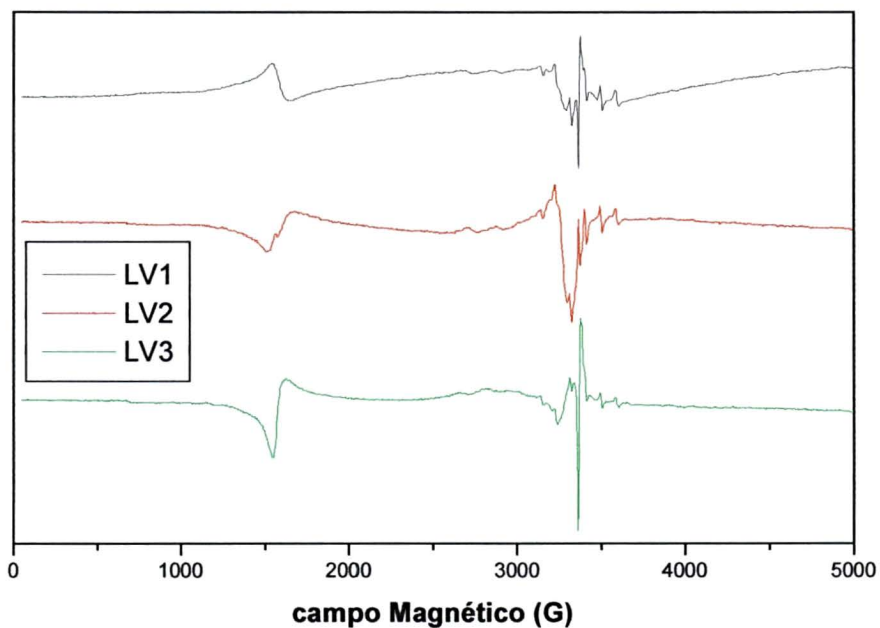
No caso de grupos aromáticos tem-se que, para a 1ª variável latente (VL), o modelo PLS explicou 43% da variância total dos dados da matriz X (EPR) e 75 % dos dados da matriz Y (NMR). Para os dados em X, a 1ª, 2ª e 3ª VL explicam 95 % da variância dos dados e para os dados da matriz Y, da 1ª a 4ª VL explicam 99 % da variância dos dados.

Na 1ª VL o sinal de RLO é bastante intenso, sugerindo a presença de grupos catecóis nestas estruturas orgânicas. Nas 1ª e 3ª VL há correlação positiva entre sinais de RLO e o sinal de Cu^{2+} , o que indica a ligação deste íon com grupos doadores da estrutura orgânica aromática. Nas 2ª e 3ª VL há correlação positiva do sinal de Fe^{3+} em domínios diluídos ($g = 4,3; 9,0$) e o sinal de RLO. Há correlação negativa entre o sinal de RLO e o sinal de Mn^{2+} , na 2ª e 3ª VL, sugerindo assim que este íon não está ligado às mesmas estruturas orgânicas que o RLO (Figura 91).

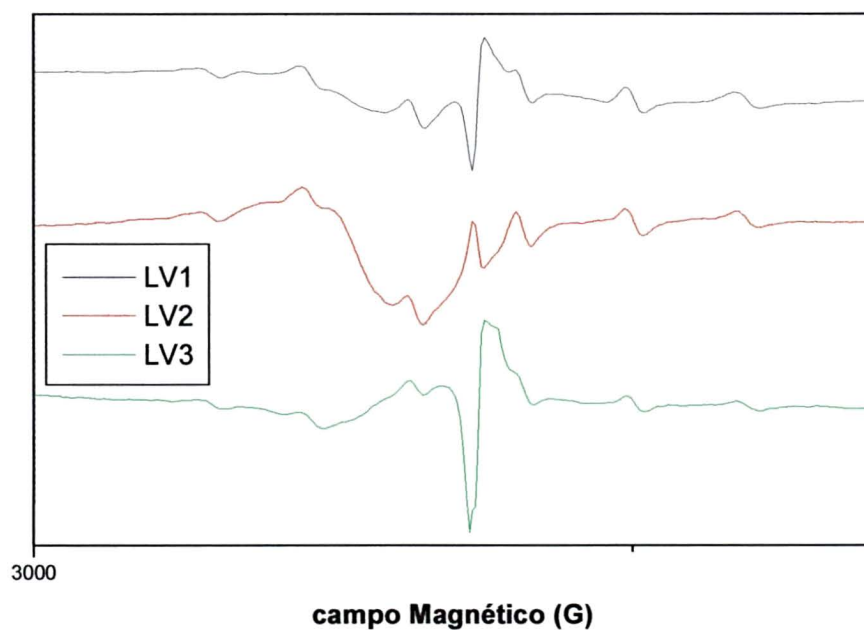
A Figura 92 a seguir mostra os três primeiros “loadings” obtidos pelo modelo PLS, utilizando os espectros de EPR e os dados dos grupamentos COOH/CON de ^{13}C NMR.

Figura 92: “Loadings” da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos COOH/CON nos espectros de ^{13}C NMR]] e espectros de EPR (0 - 5000 G – A e ~ 2000 – 3500 G - B) dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solo sob diferentes manejos.

(A)



(B)



No caso das percentagens de grupos carboxílicos/amidas, tem-se que para as 1ª, 2ª e 3ª VL, o modelo PLS explicou 96% da variância total dos dados para a matriz X (EPR) e 92 % dos dados da matriz Y (NMR).

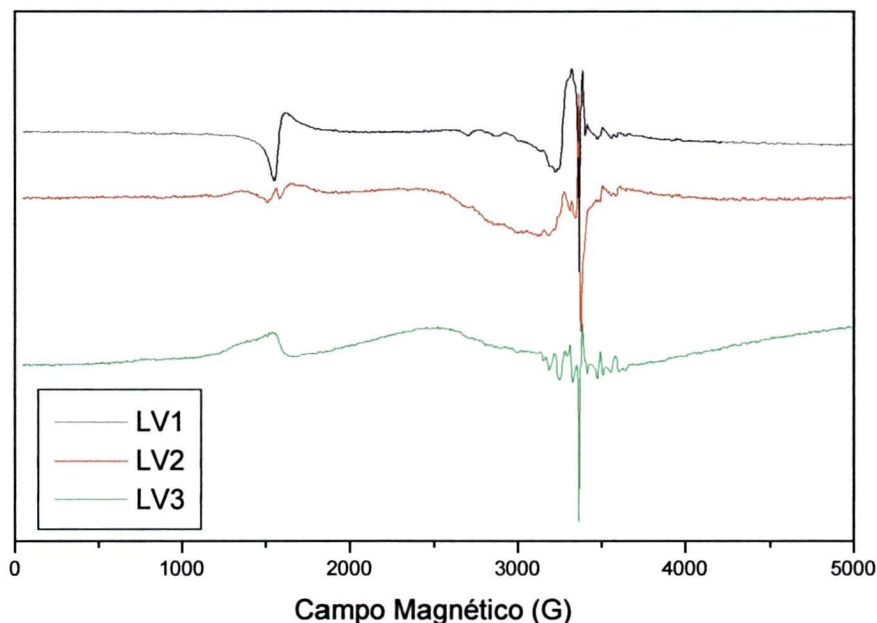
A 1ª VL correlaciona positivamente o sinal de Fe^{3+} em domínios diluídos ($g = 4,3$) com os grupos COOH/CON , e negativamente com o sinal de RLO. Isto sugere a complexação destes Fe^{3+} com grupos catecolatos, consumindo o-semiquinonas (RLO) para isto.

Com exceção da 1ª VL, as demais apresentaram correlação negativa entre grupos COOH/CON com o sinal de Fe^{3+} em domínios diluídos ($g = 4,3$), sugerindo, agora, a complexação de Fe^{3+} com grupos COO^- . Há correlação positiva do sinal de Mn^{2+} nas 3 VL com os grupos COOH/CON , e negativa entre o RLO e o Mn^{2+} . (Figura 92).

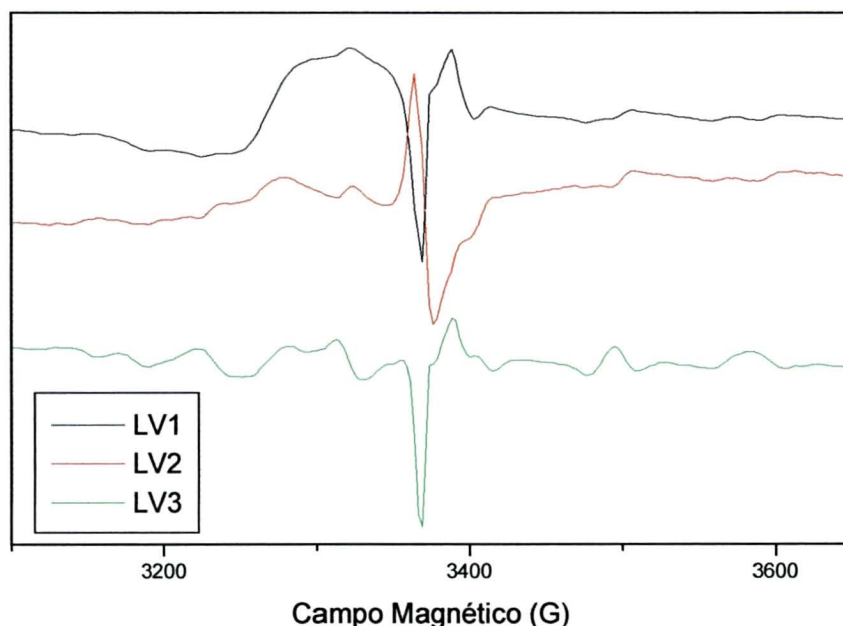
A Figura 93 a seguir mostra os três primeiros “loadings” obtidos pelo modelo PLS, utilizando os espectros de EPR e os dados dos grupamentos alifáticos de ^{13}C NMR.

Figura 93: “Loadings” da 1ª, 2ª e 3ª variável latente (VL) para o modelo PLS, com os dados de NMR [(abundância relativa (%)) para as regiões de ressonância de grupos alifáticos nos espectros de ^{13}C NMR]] e espectros de EPR (0 - 5000 G – A e ~ 2000 – 3500 G - B) dos ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) de solo sob diferentes manejos

(A)



(B)



Para grupos alifáticos, se observa que para a 1ª VL, o modelo PLS explicou 44% da variância total dos dados da matriz X (EPR) e 37 % dos dados da matriz Y (NMR). Para os dados em X, a 1ª, 2ª e 3ª VL explicam 90 % da variância dos dados e para os dados da matriz Y, da 1ª a 4ª VL explicam 80 % da variância dos dados.

Na 1ª VL há uma correlação negativa entre grupos alifáticos com o sinal de RLO, Cu^{2+} e Fe^{3+} em $g = 4,3$. No caso de grupos alifáticos tem-se que o sinal de RLO é intenso nas 3 VL, porém, ao contrário do que ocorria com as estruturas aromáticas, agora a 1ª VL apresenta correlações da linha de RLO (linha fina em ~ 3400 G), de Cu^{2+} (linha um pouco mais larga em ~ 3300 G) e de Fe^{3+} ($g = 4,3$, 1500 G) positivas entre elas, mas negativas com relação à variável Y.

Na 2ª VL RLO e Cu^{2+} apresentam correlações positivas entre suas linhas e a variável Y, mas negativas com relação à linha de Fe^{3+} em domínios diluídos.

Somente na 3ª VL a linha de Fe^{3+} em $g = 4,3$ apresenta correlação positiva com a variável Y, sugerindo o alto caráter hidrofóbico das estruturas alifáticas das SH estudadas (Figura 93).

4.2.3.5 Nova Metodologia de Caracterização de SH de Solo (PLS aplicado às análises de DRIFT e EPR “versus” NMR) - Conclusões Parciais

Ao se fazer uso do método PLS, e ao se observar os “loadings”, tem-se informações mais claras do que apenas pela observação dos espectros.

Estes resultados mostram que a aplicação de métodos quimiométricos aos dados de espectroscopias de NMR, do EPR e DRIFT é uma metodologia útil que pode dar nova aproximação aos estudos dos aspectos de estruturas químicas de SH. Nossos resultados mostram que a função ácido carboxílico é, principalmente, componente de estruturas aromáticas. Das interpretações dos “loadings” sugere-se que estas previsões são correlações bem fundamentadas em diferenças estruturais entre as amostras estudadas por espectroscopias de ^{13}C -NMR, EPR e DRIFT.

Como observado na Tabela 36, as previsões entre o valor real e o valor estimado pelo modelo PLS das % dos grupamentos orgânicos de NMR são boas. A partir destes resultados, sugere-se o uso das análises por DRIFT e/ou EPR na obtenção dos percentuais de grupos funcionais orgânicos nas estruturas das SH, como são obtidos por NMR de ^{13}C em amostras sólidas. A metodologia aqui aplicada fez uso de três espectroscopias de diferentes fundamentos - momento de dipolo magnético eletrônico para EPR e momento de dipolo elétrico para DRIFT - para prever dados de outra espectroscopia que tem fundamentos em momento de dipolo magnético nuclear - NMR de ^{13}C . Assim, a metodologia aplicada nesta tese torna possível a caracterização mais eficaz de SH, acessível, tanto técnica quanto economicamente, a laboratórios que não disponham de equipamentos de NMR para análise de sólidos. Janick e colaboradores 2000 desenvolveram metodologia semelhante para substituir as caras e complicadas análises de datação de MOS, por decaimento radioativo de ^{14}C , utilizando métodos quimiométricos (PLS), aplicados em dados de DRIFT.

5 CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÕES PARCIAIS – INCORPORAÇÃO DE NITROGÊNIO A LODO BIOLÓGICO

Os processos de nitrificação/oxidação, redução e nitrificação/oxidação/redução realizados até o momento, bem como as análises feitas nas respectivas amostras, permitem-nos um conhecimento das estruturas químicas presentes nas amostras pura, nitradas e reduzidas. Isto é de grande importância para a elucidação das estruturas químicas presentes nas amostras em se tratando de um material complexo como este em estudo e de otimização dos parâmetros para as melhores relações custo/benefício.

O planejamento fatorial 2^3 no processo nitrificação/oxidação nos permite sugerir que:

(i) A partir da análise por gráficos normais se verificou que para a região de grupos nitro os únicos efeitos significativos são o efeito da concentração de HNO_3 e a interação (concentração x tempo). Já para a região de grupos carboxílicos e carboxilatos os efeitos significativos são a concentração de HNO_3 , a interação (concentração x tempo) e a temperatura, sendo o último menos acentuado

(ii) Através da superfície de resposta para grupos nitro, se pode verificar que a região de maior rendimento (em vermelho), está na região de baixa concentração de HNO_3 (1mol L^{-1}) e na região de tempo de reação entre 6 e 9 horas. Para a região de grupos carboxílicos e carboxilatos, se tem a região central como de maior resposta, concentração de HNO_3 entre 2 e 4mol L^{-1} e tempos de reação entre 8 e 10 horas.

(iii) Como a diferença entre as respostas para grupos carboxílicos e carboxilatos é baixa entre 6 e 9 horas, se optou por escolher como ponto ótimo o ensaio com concentração de HNO_3 de 1mol L^{-1} e tempo de reação de 6 horas. Desta forma se tem o máximo de nitrificação e um razoável teor de oxidação.

O planejamento em estrela no processo nitração/oxidação nos permite sugerir que:

(i) Para a obtenção de bom rendimento na região de grupos nitro, sem grande perda na região de grupos carboxílicos e carboxilatos (aspecto interessante na formação de grupos NO_2 e grupos queladores de metais, o que é um dos objetivos no material estudado, a produção de FLLN) se pode optar por concentração de HNO_3 de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tempo de reação de 5 horas, aproximadamente.

O processo redução nos permite sugerir que:

(i) É possível se optar pelo ensaio R8 (redução com palha de aço) por ser um processo mais econômico que o R7 (Fe^0) e mais viável em termos ambientais que o R3 (SnCl_2).

O processo de nitração/redução nos permite sugerir que:

(i) Este processo pode ser adotado, pois os cálculos de área mostraram um grande aumento na área da região de grupos nitro na amostra nitrada em relação ao lodo puro e uma diminuição considerável do lodo nitrado para o lodo reduzido.

Para este trabalho, a patente está em fase de elaboração, conforme normas de publicação do CNPq, e será submetida ainda neste ano.

5.2 CONCLUSÕES PARCIAIS – EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO

Verificaram-se diferenças estruturais nas amostras extraídas a diferentes pH (7,6, 10,6 e 12,6) utilizando-se as espectroscopias de EPR, FTIR e UV-VIS.

As amostras extraídas a pH 12,6, em especial a terceira extração a pH 12,6, apresentam um maior teor de matéria orgânica extraída, indicando assim a eficiência do processo sequencial de extração. Isto foi observado tanto por espectroscopia de EPR quanto de FTIR. Também por estas espectroscopias verificou-se que comparando as amostras extraídas a mesmo pH 7,6 e 10,6, somente as amostras das primeiras extrações, AHCN176 e AHCN110 estavam menos contaminadas por estruturas inorgânicas. As amostras das segundas e terceiras extrações a pH 7,6 (AHCN276 e AHCN376) e a pH 10,6 (AHCN210 e AHCN310), apresentaram teores crescentes de argilas, como demonstrado pelas absorções de FTIR em 3700 cm^{-1} (O-H de argilas) e 1100 cm^{-1} (Si-O) e de EPR em $g = 4,3$ e $g \sim 2$ (Fe^{3+} em domínios diluídos e em domínios concentrados, respectivamente). Sugere-se que estas estruturas inorgânicas também foram extraídas ou podem estar fortemente ligados à matéria orgânica extraída. Este comportamento não é observado a pH 12,6 onde se verifica a melhor extração em termos de componentes orgânicos.

Por espectroscopia de EPR, na temperatura de nitrogênio líquido (77 K) identificaram-se íons de Cu^{2+} ligados a grupos oxigenados na amostra AHCN176 (primeira extração a pH 7,6) e ligados a grupos com nitrogênio como átomo doador nas amostras AHCN276 e AHCN376. Os teores de radicais livres orgânicos das amostras estudadas caem com o avanço das extrações em pH 7,6 e 10,6, e aumentam com as extrações em pH 12,6.

Por espectroscopia de UV-VIS, sugere-se que os AH mais condensados (menor razão E4/E6), foram extraídos em pH 10,6; e os menos humificados em pH 12,6 (maior razão E4/E6), com constituição química aromática menos condensada. De modo geral, devido aos baixos valores de E2/E4 e E4/E6, sugere-se que estas substâncias húmicas são mais humificadas, com constituição

química aromática mais condensada, sugerindo possível aumento da massa molecular.

Ao se comparar os AF e AH de solo sob floresta extraídos a diferentes pH, isolados utilizando-se resina XAD-8 ou não, observa-se que há diferenças entre as frações. Os AF apresentaram sinais de Mn^{2+} , os quais não foram verificados nos AH. O sinal de RLO e Cu^{2+} é mais intenso nos AH que nos AF. Aplicando-se a PCA, através dos gráficos de "loadings" e "scores", têm-se uma nova metodologia de identificação das estruturas orgânicas e inorgânicas nos AH e AF estudados.

Ao se fazer uso do método PLS aos resultados das análises por DRIFT e/ou EPR, sugere-se que a obtenção dos percentuais de grupos funcionais orgânicos nas estruturas das SH, como são obtidos por NMR de ^{13}C em amostras sólidas é bastante satisfatória. Sugere-se assim, uma nova metodologia de caracterização de SH, acessível, confiável e eficaz tanto técnica quanto economicamente.

5.3 CONCLUSÕES FINAIS

Esta tese procurou desenvolver metodologia científica com fortes possibilidades de aplicações tecnológicas a problemas ambientais típicos do Estado do Paraná e do Brasil. O destino adequado, econômica e ambientalmente falando, para os rejeitos da indústria de celulose é objetivo atual tendo em vista recentes desastres ambientais como o da Indústria Cataguazes de Minas Gerais. Por outro lado, há preocupações na manutenção da estrutura e produtividade de nossos solos que são submetidos a intensas atividades de uso agrícola, nem sempre as mais adequadas. Foi mostrado, em escala de laboratório, que há possibilidade de se produzir fertilizante de liberação lenta de N, à partir de lodo biológico das lagoas de decantação das indústrias de celulose.

Empregou-se o método da extração sequencial e exaustiva a diferentes pH, de SH de solo, na tentativa de promover maior entendimento das estruturas das SH de solo. Este método é extremamente trabalhoso e inédito no estudo de solos brasileiros. Foi proposta e desenvolvida também metodologia de determinação

quantitativa de grupos funcionais orgânicos das SH a partir de espectros de DRIFT e EPR, com o intuito de caracterizar interações entre as estruturas inorgânicas – orgânicas em SH de solo, submetido a diferentes tipos de manejo. Uma característica complicadora no estudo das SH dos solos brasileiros diz respeito ao alto teor de Fe^{3+} , que muitas vezes torna impossível a análise por NMR. Assim, ao desenvolvermos esta nova metodologia, tornamos a caracterização das SH mais viável tanto em termos técnicos como econômicos.

5.4 PERSPECTIVAS DE TRABALHO

Como trabalho a ser desenvolvido há necessidade de se ampliar os experimentos de nitratação/oxidação aplicando-os a outros rejeitos industriais como os dos diferentes processos de obtenção de papel e celulose.

Com relação à importante determinação de funções orgânicas das SH e interações inorgânicas - orgânicas por espectroscopia de DRIFT e/ou EPR, o modelo necessita ser mais robusto; para tanto, será interessante usar um maior número de amostras, de diferentes ambientes.

Além de se estudar as frações AH e AF, há necessidade de se conhecer mais sobre a fração Humina, importante fração em termos de seqüestro de carbono.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARD, F.K. **Chemische Untersuchung des Torfs**. *Chem. Zentr.*, 2, 391, 1786.
- ADAMS, M.J., **Chemometrics in Analytical Spectroscopy**. The Royal Society of Chemistry, 1995.
- AGRAWAL, A.; TRATNYEK, P. G., Reduction of nitro aromatic compounds by zero-valent iron metal. **Environ. Sci. Technol.**, n. 30, p. 153-160, 1996.
- AIKEN, G.R.; THURMAN, E.M.; MALCOLM, R.L.; WALTON, J. F. Comparison of XAD Macroporous Resins for the Concentration of Fulvic Acid from Aqueous Solution. **Anal. Chem.** v. 51, p. 1799-1803, 1979.
- AIKEN, C.R. Isolation and Concentration Techniques for Aquatic Humic substances. In: AILCEN, O.K.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. **Humic Substances in Soil, Sediment and Water, Geochemistry, Isolation and Characterisation**. Wiley, New York, 1985. p. 363-385.
- AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. Wiley, New York, 181-210.
- ALEXANDROVA, L.N. The Use of Sodium Pyrophosphate for Isolating Free Humic Substances and their Organic-Mineral Compounds from the Soil. **Soviet Soil Sci.** v. 2, p. 190-197, 1960.
- ALLISON, F.E. **Soil Organic Matter and its Role in Crop Production**. Elsevier, Amsterdam, 1973.
- ALMENDROS, G. Sorptive interactions of pesticides in soils treated with modified humic acids. **Europ. J. Soil Sci.**, Oxford, v. 46, p. 287-301, 1995.
- ALVAREZ, R.; CLEMENTE, C.; GÓMEZ-LIMÓN, D. The influence of nitric acid oxidation of low rank coal and its impact on coal structure. **Fuel**, v. 82, n. 15-17, p. 2007-2015, 2003.
- ANDERSON, H.A.; BICK, W.; HEPBURN, A.; STEWART, M. Bitrobin in Humic Substances. In: HAYES, M.H.B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S. **Humic Substances II. In search of Structure**. Wiley, Chichester, 1987. p. 223-256.
- AROCENA, J. M.; PAWLUK, S.; DUDAS, M. J.; GAJDOSTIK, A. In situ investigation of soil organic matter aggregates using infrared microscopy. **Can. J. Soil Sci.**, Ottawa, v. 75, n. 3, p. 327-332, 1995.
- BAES, A. U.; BLOOM, P. R. Diffuse reflectance and transmission Fourier transform infrared (DRIFT) spectroscopy of humic and fulvic acids. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 53, p. 695-700, 1989.
- BAKER, R.A. Trace Organic Contaminant Concentration by Freezing. IV Ionic Effects. *Water Res.*, v. 4, p. 559-573, 1970.
- BARTON, D. H. R., SCHNITZER, M. A new experimental approach to the humic acid problem. **Nature**, v. 198, p. 217-218, 1963.
- BAYER, C.; Martin-Neto, L.; Mielniczuk, J.; Saab, S. da C.; Milori, D. M. P.; Bagnato, V. S. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. **Geoderma**, v. 105, n. 1-2, p. 81-92, 2002.

- BOGACKI, M. B.; MICHALSKA, I.; KRYSZTAFKIEWICZ, A. Application of experimental design for optimization of physicochemical properties of the inorganic pigment, iron(III) silicate. **Dyes and Pigments**, v. 61, n. 2, p. 149-164, 2004.
- BOHN, H.L.; MCNEAL, B.L.; O'CONNOR, G.A. **Soil Chemistry**. John Wiley & Sons, New York. 1985.
- BRATCHELL, N., Cluster Analysis. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, v. 6, p. 105-125, 1989.
- BRAVARD, S.; RIGHI, D. Characterization of fulvic and humic acids from oxisol-spodosol toposequence in Amazônia. Brazil. **Geoderma**, v. 148, p. 151-162, 1991.
- BREMNER, J.M.; LEES, H. Studies of Soil Organic Matter H. The Extraction of Organic Matter from Soil by Neutral Reagents. **J Agric. Sci.**, v. 39, p. 274-279, 1949.
- BUDZIAK, C.R.; MAIA, C.M.F.; MANGRICH, A. S. Transformações Químicas da Matéria Orgânica Durante a Compostagem de Resíduos da Indústria Madeireira. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.
- CAETANO, I.K. Caracterização de Ácidos Húmicos em Solos Sob Diferentes Manejos Tendo Em Visão o Seqüestro de Carbono. Tese de Doutorado, Curitiba, 2002.
- CARDOSO, S. H.; CARNEIRO, J. W. de M., Nitração aromática: substituição eletrofílica ou reação com transferência de elétrons? **Quim. Nova**, v. 24, n. 3, p. 381-389, 2001.
- CELI, L.; SCHNITZER, M.; NÈGRE M. Analysis of carboxil groups in soil humic acids by a wet chemical method, fourier-transform infrared spectrophotometry, and solution-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. A comparative study. **Soil Science**. New York, v. 162, n. 3, p. 189-197, 1997.
- CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 41, n. 2, p. 352-358, 1977.
- CHOUDRI, M.H.; STEVENSON, F.J. Chemical and Physicochemical Properties of Soil Colloids. III. Extraction of Organic Matter from Soils. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v. 21, p. 508-513, 1957.
- CHRISTY, A. A.; EGEBERG, P. K. Characterization of natural organic matter from the Nordic typing project water samples by chemometric analysis of their near infrared spectral profiles. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 50, p. 225-234, 2000.
- CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B. Isolation of Humic Substances from a Mollisol using a Sequential and Exhaustive Extraction Process. In: Proceedings of the Seventh International Meeting of the IHSS, 7^o, 1996, Trinidad, In press.
- CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B.; SWIFT, R.S. Isolation, Fractionation, Functionalities, and Concepts of structures of Soil Organic Macromolecules. In: BECK, A.J.; JONES, K.C.; HAYES, M.H.B.; MINGEIRIN, U. **Organic Substances in Soil and Water: Natural Constituents and their influences on Contaminant Behaviour**. Royal Society of Chemistry, 1993. v. 3, p. 1-69.
- CLAPP, C.E.; LAYESE, M.F.; HAYES, M.H.B.; HUGGINS, D.R.; AILMARAS, R.R. **Natural Abundance of It in Soils and Water**. Royal Society Chemistry. 1996.

- COLINVAUX, P. **Ecology**. J Wiley & Sons, New York. 1986.
- DEINZER, M.; MELTON, R.; MITCHELL, D. Trace Organic Contaminants in Drinking Water: Their Concentration by Reverse Osmosis. **Water Res.**, v. 9, p. 799-805, 1975.
- DEIWICHE, C.C.; STEYN, P.L. Nitrogen Fractionation in Soils and Microbial Reactions. **Environ. Sci. Tech.**, v. 4, p. 929-935, 1970.
- DICK, D. P.; GOMES, J.; ROSINHA, P. B. Caracterização de substâncias húmicas extraídas de solos e de lodo orgânico. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, v. 22, p. 603-611, 1998.
- DICK, D. P.; MANGRICH, A. S.; MENEZES, S. M. C.; PEREIRA, B. F., Chemical and spectroscopical characterization of humic acids from two south Brazilian coals of different ranks. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 2, p. 177-182, 2002.
- DITTMAR, T; LARA, R. J. Molecular evidence for lignin degradation in sulfate-reducing mangrove sediments (Amazonia, Brazil). **Geochim Cosmochim Acta**. v. 65, n. 9, p. 1417-1428, 2001a.
- DITTMAR, T; LARA, R.J.; KATTNER, G. River or mangrove? Tracing major organic matter sources in tropical Brazilian coastal waters. **Mar Chem**. v. 73, n. 3-4, p. 253-271, 2001b.
- DUBACH, P.; MEHTA, N.C. The Chemistry of Soil Humic Substances. **Soils and Fertilisers**, v. 26, p. 293-300, 1963.
- DUFFY, B. K.; OWNLEY, B. H.; WELLER, D. M. Soil Chemical and Physical Properties Associated with Suppression of Take-all of Wheat by *Trichoderma koningii*. **Phytopathology**. v. 87, p. 1118-1124, 1997.
- DYER, A. **An Introduction to Liquid Scintillation Counting**. Heyden, London, 1975.
- DYER, A. **Liquid Scintillation Counting Practice**. Heyden, London, 1980.
- EBERLE, S.H.; SCHWEER, K.H. Bestimmung von Huminsäure und Ligninsulfonsäure im Wasser Durch Flüssig-Flüssigextraktion. **Vom Wasser**, v. 41, p. 27-u, 1974.
- ENKE, F.; STUTTGART SCIACOVELLI, O.; SENESI, N.; SOLINAS, V.; TESTINI, C. Spectroscopic Studies on Soil Organic Fractions. L JR and NMR Spectra. **Soil Biochem.**, v. 9, p. 287-293, 1977.
- EUTERHUES, K.; RUMPEL, C.; KLEBER, M.; KNABNER, I. K. Stabilisation of Soil Organic Matter by Interactions with Minerals as revealed by Mineral Dissolution and oxidative Degradation. **Organic Geochemistry**. v. 34, p. 1591-1600, 2003.
- FELBECK, G.T. In: MCLAREN, A.D.; SKUJINS, J. (Eds.). **Soil Biochemistry**. Dekker, New York, 1971. Volume 2, p. 36-59.
- FLAIG, W.; BEUTEISPACHER, H.; RICTZ, E. Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances. In: GJESSING, I.E. (Ed.). **Soil Components**. Springer-Verlag, New York, 1975. Volume 1, p. 1-211.
- FLAIG, W. Generation of Model Chemical Precursors. In: FRIMMEL, F.H.; CHRISTMAN, R.F. (Eds) **Humic Substances and Their Role in the Environment**. Wiley, Chichester, 1988. p. 75-92.
- FORINA, M.; ARMANINO, C.; LANTERI, S.; LEARDI, R.; Methods of Varimax Rotation in Factor Analysis with Applications in Clinical and Food Chemistry. **J. Chemom.**, v. 3, p. 115-125, 1988.

FREUDENBERG, K.; NEISH, A. C. **Constitution and biosynthesis of lignin**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1968. p. 298.

FRIEDERMANN, G. R. **Síntese e caracterização química e eletroquímica de compostos macrocíclicos do tipo dibenzotetraazaanulenos análogos a metaloporfirinas**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química.

FULLER, M.P.; GRIFFITS, P.R.; Diffuse Reflectance Measurements by Infrared Fourier-Transform Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.50, p. 1906-1910, 1978.

FULLER, M.P.; GRIFFITS, P.R. Infrared-Analysis by Diffuse Reflectance Spectrometry. **American Laboratory**, v. 10, p 69-8, 1978.

GARCÍA-GÓMEZ, A.; ROIG, A.; BERNAL, M. P. Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. **Bioresource Technology**. v. 86, p. 59-64, 2003.

GARCIA, D.; CEGARRA, I.; ABAD, M.; FOMES, F. Effects of the Extractants on the Characteristics of a Humic Fertiliser Obtained from Lignite. **Biores. Technol.** v. 43, p. 221-225, 1993.

GELADI, P.; ISAKSSON, H.; LINDQVIST, L.; WOLD, S.; ESBENSEN, K. Principal component analysis of multivariate images. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 5, n. 3, p. 209-220, March 1989.

GOB, K.M.; REID, M.R. Molecular Weight Distribution of Soil Organic Matter as Affected by Acid Pre-Treatment and Fractionation into Humic and Fulvic Acids. **J. Soil Sci.**, v. 26, p. 207-222, 1975.

GONZÁLEZ-PRIETO, S.J.; VILLAR, M. C.; CARBALLAS, M.; CARBALLAS, T. **Plant Soil**, v. 31, p. 144, 1992.

GONZALEZ-VILA, F. J.; LENTZ, H.; LÜDEMANN, H. D. ¹³ C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. **Biochem. biophys. Res. Comm.** v.72, p. 1063-1070, 1976.

GOODMAN, B. A.; HALL, P. L. Electron paramagnetic resonance spectroscopy, in WILSON, J. M. (Ed.) **Clay Mineralogy: Spectroscopic and chemical determinative methods**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 173-225.

GORRET, N.; BIN ROSLI, S. K.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P. A.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, v. 108, n. 3, p. 253-263, 18 March 2004.

GREENLAND, D. Interaction Between Clay and Organic Compounds in Soil: 11+ Adsorption of Soil Organic Compounds and its Effect on Soil Properties. **Soils and Fertilisers**, v. 28, p. 521-532, 1965.

GREENLAND, D. Interactions Between Humic and Fulvic Acids and Clays. **Soil Sci.**, v. 111, p. 34-41, 1971.

GRØN, C.; RABEN-LANGE, B. Isolation and Characterisation of a Haloorganic Soil Humic Acid. **Sci. Tot Environ.** v. 113, p. 281-286, 1992.

GUIMARÃES, E. **Caracterização química, espectroscópica e por análise térmica de ácidos húmicos e vermicompostos obtidos de esterco de diferentes animais**. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química.

GUIMARÃES, E.; MANGRICH, A. S. Caracterização de Complexos de Mn^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} em Ácidos Húmicos de Vermicompostos por Espectroscopia de EPR. In: 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 20ª, Poços de Caldas - MG, 1997. **Química: Academia, Indústria, Sociedade** - Livro de Resumos.

GUIMARÃES, E.; MANGRICH, A. S.; MACHADO, V. G.; TRAGHETTA, D. G.; LOBO, M.A. Criteria Preparation of Earthworm-Composts in View of Animal Waste Recycling. Part II. A Synergistic Utilization Of EPR and 1H NMR Spectroscopies on the Characterizations of Humic Acids from Vermicomposts. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 6, p. 734-741, 2001.

GÜNTHER, H. **NMR spectroscopy – basic principles, concepts, and applications in chemistry**. 2nd ed. New York, Wiley. 1995.

HAALAND, M. do D.; THOMAS, V. T. Métodos least-squares parciais para a análise espectrosc. 1. Relação a outros métodos quantitativos da calibração e a extração da informação qualitativa. **Chemistry Analítico**. v. 60, p. 1193-1202, 1988.

HARRISON, et al. Reciclagem de Resíduos Industriais e Urbanos em Áreas de reflorestamento. IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Nº 196, Julho de 2003. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicações/ctecnica>> acesso em 28 de out. 2003.

HAÜSLER, M.J. **Studies of interaction of some imidazoline herbicides with whole soils, oxyhydroxides and with natural and synthetic humic acids**. Birmingham, 1986. Ph.D. Thesis. The University of Birmingham.

HAÜSLER, M.J.; HAYES, M.H.B. Uses of the XAD-8 resin and acidified dimethylsulfoxide in studies of humic acids. p. 25-32. In CLAPP, C.E.; et al. (ed.) **Humic substances and organic matter in soil and water environments: Characterization, transformations and interactions**. IHSS, University of Minnesota, St. Paul. 1996.

HAW, J.F.; SCHULTZ, T.P. Carbon-13 CP/MAS NMR and FT-IR Study of Low-Temperature Lignin Pyrolysis. **Holzj'orschung**, v. 39, p. 289-296, 1985.

Hayes, F. N. Liquid Scintillators: Attributes and Applications. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, v. 1, p. 46-56, 1956.

HAYES, M.H.B.; STACEY, M.; THOMPSON, J.M. Adsorption of 5-triazine Herbicides by Soil Organic Matter Preparations. **Isotopes and Radiation in Soil Organic-Matter Studies**. IABA, Vienna, p. 75-90, 1968.

HAYES, M.H.B.; SWIFT, R.S.; WARDLE, R.E.; BROWN, J.K. Humic Materials from an Organic Soil: A Comparison of Extractants and of Properties of Extracts. **Geoderma**, v. 13, p. 231-245, 1975a.

HAYES, M.H.B.; PICK, M.E.; TOMS, B.A. Interactions Between Clay Minerals and Bipyridylum Herbicides. **Residue Rev.**, v. 57, p. 1-25, 1975b.

HAYES, M.H.B.; SWIFT R.S. The Chemistry of Soil Organic Colloids. In: GREENWOOD, D.J.; HAYES, M.H.B. (Ed.). **The Chemistry of Soil Constituents**. Wiley, Inter-Science, New York, 1978. p. 179-230.

HAYES, M.H.B. Extraction of Humic Substances from Soil. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. (Ed.). **Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. Geochemistry, Isolation, and Characterisation**. Wiley, New York, 1985. p. 147-180.

- HAYES, M.H.B. **Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. Geochemistry, Isolation, and Characterisation.** Wiley, New York, 1985. p. 147-180.
- HAYES, M.H.B. Extraction of humic substances from soils. In: G. AIKEN et al. **Humic substances in soil, sediment, and water: Geochemistry, isolation and characterization.** Wiley, New York, 1985. p. 329-362.
- HAYES, M.H.B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S. Structures of Humic Substances: The Emergence of 'Forms'. In: HAYES, M.H.B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S. (Eds.). **Humic Substances II in Search of Structure.** Wiley, Chichester, 1989. p. 691-733.
- HAYES, M.H.B.; SWIFT, R.S. Genesis, Isolation, composition and Structures of Soil Humic Substances. In: DEBOODT, M.F. et al. **Soil Colloids and their associations in Aggregates.** Plenum, New York. 1990. p. 245-305.
- HAYES, M.H.B.; MINGELGNIN, U. Interactions Between Small Organic Chemicals and Soil Colloidal Constituents. In: BOLT, G.H.; DEBOODT, M.F.; HAYES, M.H.B.; MCBRIDE, M.B. (Eds.). **Interactions a the Soil Colloid-Soil Solution Interface.** Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1991. p. 323-407.
- HAYES, M.H.B. AND SWIFT R.S. Genesis, Isolation, Composition and Structures of soil Humic Substances. In: DEBOODT, M.F.; HAYES, M.H.B.; HERBILLON, A. (Eds.). **Soil Colloids and Their Associations in Aggregates.** Plenum, New York and London, 1991. p. 245-305.
- HAYES, M.H.B.; CLAPP, C.E.; MALCOLM, R.L.; DUBOIS, M.M. Analysis of Humic Substances by C-13 Methodology. Presented at Annual Meeting of the Soil Sci. Soc. Am., Cincinnati, OH. In: **Agron. Abstr.**, p. 250, 1993.
- HAYES, T.M. **Study of the humic substances from soils and waters and their interactions with anthropogenic organic chemicals.** Birmingham, 1996, PhD diss. University of Birmingham.
- HAYES, M.H.B.; GRAHAM, C.L. Procedures for the isolation and fractionation of humic substances. In: DAVIES, G.; GHABBOUR, E.A. **Humic substances. Versatile components of plants, soils and waters.** Roy. Soc. Chem., Cambridge. 2000. p. 91-109.
- HAYES, M. H. B; MALCOLM, L.R. Considerations of compositions and of aspects of the structures of Humic Substances. In: **Humic Substances and Chemical Contaminants.** Madison: Soil Science Society of America, Copyright, 2001. p. 3-39.
- HEMPFLING, 1987 IN JANIK, L. J.; MERRY, R. H.; SKJEMSTAD, J. O. **Aust. J. Soil. Res.** v. 38, p. 681-696, 1998.
- HORWATH, W. R.; ELLIOT, L. F.; STEINER, J. J.; DAVIS, J. H.; GRIFFITH, S. M. Denitrification in Cultivated and Noncultivated Riparian Areas of Grass Cropping Systems. **J. Environ. Qual.** v. 27, p. 225-231, 1998.
- HU, W.; MAO, J.; XING, B.; SCHMIDT-ROHR, K. Poly(methylene) Crystallites in Humic substances detected by nuclear magnetic resonance. **Environ. Sci. Technol.**, v. 34, p. 530-534, 2000.
- HWANG, C.P.; LACKIE, T.H.; MUNCH, R.R. Correction for Total Organic Carbon, Nitrate and Chemical Oxygen Demand when using the MF - Millipore Filter. **Environ. Sci. Technol**, v. 13, p. 871-872, 1979.

- INBAR, Y.; CHEN, Y.; HADAR, Y. Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 53, p. 1695-1701, 1989.
- IZAURRALDE, R. C.; SOLBERG, E. D.; NYBORG, M.; MALHI, S. S. Immediate effects of topsoil removal on crop productivity loss and its restoration with commercial fertilizers. **Soil and Tillage Research**, v. 46, n. 3-4, p. 251-259, 2 June 1998.
- JANIK, L.J.; SKJEMSTAD, J.O. Characterization and Analysis of Soils Using Mid-Infrared Least-Squares. II. Correlations With some Laboratory. Data. **Aus. J. Soil Res**, p. 637-650, 1995.
- JANIK, L. J.; MERRY, R. H.; SKJEMSTAD, J. O. **Aust. J. Soil. Res.** v. 38, p. 681-696, 1998.
- JEFFREY, L.M.; HOOD, D.W. Organic Matter in Sea Water - An Evaluation of Various Methods for Isolation. **J Marine Res.**, v. 17, p. 247-271, 1958.
- JOHANSSON M.; STENBERG B.; TORSTENSSON L. Microbiological and chemical changes in two arable soils after long-term sludge amendments. **Biology and Fertility of Soils**. v. 30, n. 1-2, p. 160-167, nov 1999.
- JÖRESKOG, K. G.; KLOVAN, J. E.; REYMENT, R. A. Geological Factor Analysis. **Elsevier**, Amsterdam, v. 59, p. 86-115, 1976.
- KIWATSUKA, S.; WATANABE, A.; ITOH, K.; ARIA, S. Comparison of two Methods of Preparation of Humic and Fulvic Acids, IHSS method and NAGOYA Method. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 38, p. 23-30, 1992.
- KLÖCKING, R.; MÜICHE, D. Isolierung Wasserlöslicher Huminsäuren (Fulvosäuren) aus Ihren Blei(II)-Chelatverbindungen. **Z Chent**, v. 9, p. 453-545, 1969.
- KONONOVA, M. M. **Soil organic matter: its nature, its role in soil formation and in soil fertility**. 2 ed. New York: Pergamon, 1966.
- KRAUS, H. T., WARREN, S. L., Performance of Turkey litter compost as a slow-release fertilizer in containerized plant production. **Hortscience** v. 35, n. 1, p. 19-21, feb 2000.
- KRAUS, T. E. C.; ZASOSKI, R. J.; DAHLGREN, R. A.; HORWATH, W. R.; PRESTON, C. M. Carbon and nitrogen dynamics in a forest soil amended with purified tannins from different plant species. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 2, p. 309-321, February 2004.
- LAL, R.; KIMBLE, J.M.; LEVINE, E.; STEWART, B.A. **Soil management and greenhouse effect**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1995.
- LEENHEER, J.A. Comprehensive Approach to Preparative Isolation and Fractionation of Dissolved Organic Carbon from Natural Waters and Wastewaters. **Environ. Sci. Technol**, v. 15, p. 578-587, 1981.
- LEENHEER, J.A. **Water Analysis: Volume III**. Academic Press Inc., San Diego, USA, p. 83-165, 1984.
- LOMBARDI, K.C.; GUIMARÃES, J.L.; MANGRICH, A.S.; MATTOSO, N.; ABBATE, M.; SCHREINER, W.H.; WYPYCH, F. Structural and morphological characterization of the PP-0559 Kaolinite from the Brazilian Amazon Region. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 13, 2002.
- LOMBARDI, K.C.; MANGRICH, A. S.; GUIMARÃES, J.L. Oxidação e Redução da Matéria Orgânica de Caulinita por Espectroscopia de Fotoemissão por

- Raios-X (XPS). In: V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas – V EBSH. 5^o, Curitiba, 26 a 28 de Novembro de 2003, Universidade Federal do Paraná.
- LUNDSTROM, U. S.; NYBERG, L.; DANIELSSON, R.; VAN HEES, P. A. W.; ANDERSSON, M. Forest soil acidification: Monitoring on the regional scale. **Ambio**, v. 27, n. 7, p. 551-556, 1998.
- MAIA, C. M. B. de F.; ANDRADE, G. de C.; BOGNOLA, I. A.; RIGHESSO, C.; NASR, H. F. Avaliações e alternativas de uso para os resíduos da Iguaçu Celulose, Papel S. A., Piraí do Sul, Paraná. Relatório final de pesquisa, convênio Embrapa Florestas – Iguaçu Celulose, Papel S. A., p. 33, 1998.
- MAIA, C. M. B. de F. Boletim de Pesquisa Florestal, n. 39, p. 81-92, jul-dez 1999.
- MAIA, C. M. B. F.; SIMONELLI, F.; MANGRICH, A. S. Spectroscopic characterization of organic structures and organic-inorganic interactions on paper mill sludge. **Acta Hydroquímica et Hydrobiológica**. v. 28, n. 7, p. 372-377, 2000.
- MAIA, C.M.B.F, **Acompanhamento do Processo de Compostagem da Serragem de *Pinus taeda* pelas características Químicas e Espectroscópicas das Substâncias Húmicas em Formação**. Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Departamento de Química. Universidade Federal do Paraná.
- MADONI P.; DAVOLI D.; CHIERICI E. Comparative-analysis of the activated-sludge microfauna several sewage-treatment work. **Water Research**. v. 27, n. 9, p. 1485-1491, sep 1993.
- MAILLARD, L.C. Formation d'Humus et de Combustible Minéraux sans Intervention de l'Oxygène Atmosphérique, des Microorganismes, de Haute Température ou de Forte Pression. C.R. Acad. Sc. Paris, 1912. p. 66.
- MAILLARD, L.C. Identité des Matières Humiques de Synthèse avec les Matières Humiques Naturelles. **Ann. Chemical**. v. 7, p. 113-152, 1917.
- MALCOLM, R.L. Freeze-Drying of Organic Matter, **Clays and other Earth Materials**. U.S. Geol. Surv. Prof Paper, p. 211-216, 1968.
- MALCOLM, R.L. Method and Importance of Obtaining Humic and Fulvic Acids of High Purity. **J. Res. U.S. Geol. Surv.**, v. 4, p. 37-40, 1976.
- MALCOLM, R.L.; THURMAN, F.M.; AIKEN, OR. The Concentration and Fractionation of Trace Organic Solutes from Natural and Polluted Waters using XAD-8, a Methacrylate Resin: HEMPHILL, D.D. (Ed.). **In Trace Substances in Environmental Health - XI. A Symposium**. University of Missouri, Columbia. 1977. p. 307-314.
- MALCOLM, R.L. Geochemistry of Stream Fulvic and Humic Substances. In: Humic. 1985.
- MALCOLM, R.L.; MACCARTHY, P. Limitations in the use of Commercial Humic Acids in Water and Soil Research. **Environ. Sci. Tech.**, v. 20, p. 904-911, 1986.
- MALCOLM, R.L. Factors to be Considered in the Isolation and Characterisation of Aquatic Humic Substances. In: BOREN, H.; ALLARD, B. (Eds.). **Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment**. Wiley, London, 1991. p. 369-391.
- MALCOLM, R.L.; MACCARTHY, P. The Individuality of Humic Substances in Diverse Environments. In: WILSON, W.S. (ed.). **Advances in Soil Organic**

Matter Research: The impact on Agriculture and the Environment. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1991.

MALCOLM, R.L.; MACCARTHY, P. Quantitative Evaluation of XAD-8 and XAD-4 Resins used in Tandem for Removing Organic Solutes from Water. **Environ. int.**, v. 18, p. 597-607, 1992.

MANAHAN, S.E.; POULSON, R. E.; GREEN, J. B.; FARRIER, D. S. **Coal humic substances and their application to pollution control in the synthetic fuels industry.** Laramie Energy Technology Center, United States Departmet. of Energy, Laramie, Wyoming, September, 1978.

MANGRICH, A. S. e VUGMAN, N. V. Bonding parameters of vanadyl ion in humic-acid from the jucu river estuarine region, **Brazil Sc. Tot. Environ.**, v. 75, n. 2-3, p. 235-241, 1988.

MANGRICH, A. S. e VUGMAN, N., Vanadyl ion (VO^{2+}) as a spectroscopic probe of metal binding to nitrohumic acid. **Fuel**, v. 69, p. 925-927, 1990.

MANGRICH, A. S. **Cadernos de EPR**, LABEPR, Departamento. de Química, Universidade Federal do Paraná, 1998.

MANGRICH, A. S.; LERMEN, A. W.; SANTOS, E. J.; GOMES, R. C.; COELHO, R. R. R.; LINHARES, L. F.; SENESI, N. Electron Paramagnetic Resonance And Ultraviolet-Visible Spectroscopic Evidence For Copper Porphyrin Presence In Actinomycete Melanins From Soils. **Biology And Fertility Of Soils**, Reino Unido, v.26, p.341-345, 1998.

MANGRICH, A.S. Estruturas Químicas de Substâncias Húmicas: Estratégias de Pesquisa. In: 4º Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas-IHSS, 4º, 19 a 22 novembro 2001, Viçosa - MG, Resumos de Palestras e Trabalhos. p 15-17.

MARCHE, T.; SCHNITZER, M.; DINEL, H.; PARÉ, T.; CHAMPAGNE, P.; SCHULTEN, H. -R.; FACEY, G. Chemical changes during composting of a paper mill sludge-hardwood sawdust mixture, **Geoderma**, v. 116, n. 3-4, p. 345-356, October 2003.

MARTIN NETO, L.; NASCIMENTO, O. R.; TALAMONI, J.; POPPI, N. R. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a brazilian soil. **Soil Sci.**, New York, v. 151, p. 369-376, 1991.

MARTIN NETO, L.; ANDRIULO, A. E.; TRAGHETTA, D. G. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a Mollisol. **Soil Sci.**, New York, v. 157, p. 365-372, 1994.

MATENS, H. E.; NAES, T. **Multivariate Calibration.** Wiley New York. 1989.

MCCOY, E. L. Sand and organic amendment influences on soil physical properties related to turf establishment. **Agron. J.** v. 90, n. 3, p. 411-419, 1998.

MERCÊ, A. L. R; LOMBARDI, S. C.; MANGRICH, A. S.; LEVY, N. M.; SZPOGANICZ, B. Eletrochemical and spectroscopic studies of the complexed species of models of nitrohumic acids derived from phthalic acid-like models. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n. 3, p. 231-242, 1998.

MERCÊ, A. L. R, MANGRICH, A. S., SZPOGANICZ, B., LEVY, N. M., FELCMAN, J., Equilibrium studies of Al (III) and Fe (III) with nitrosalicylic acids – nitrohumic acid-like models. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 7, n. 2, p. 97-102, 1996.

MESSERSCHMIDT, I. Análise Quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada. Cmpinas, 1999. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

MILANOVICH, F.P.; IRELAND, R.R.; WILSON, D.W. Dissolved Yellow Organics; Quantitative and Qualitative Aspects of Extraction by Four Common Techniques. **Anal. Len.**, v. 8, p. 337-344, 1975.

MOLINER, R.; RUIZ, C.; ULIAQUE, C.; GAVILAN, J. Action of nitric-acid on lignites – mathematical models humic substances and acidity of nitrolignites. **Fuel**, v. 62, n. 11, p. 1369, 1983a.

MOLINER, R.; RUIZ, C.; ULIAQUE, C.; GAVILAN, J. Action of nitric-acid on lignites - mathematical-models .2. nitrogen forms. **Fuel** , v. 62, n. 11, p. 1369-1371, 1983b.

MORAIS, S. A. L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do Eucaliptus grandis: isolamento, quantificação e análise estrutural**. Belo Horizonte: UFMG, 1992. 260p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais.

MORO, L., Caracterização, distribuição e análise econômica dos resíduos industriais da Champion Papel e Celulose Ltda. p. 155-166. Em: GERRINI, I. A., BELLOTE, A. F. J. e BÜLL, L. T., Anais Seminário Sobre Uso De Resíduos Industriais E Urbanos Em Florestas. Botucatu, FCA/UNESP, 215 p, 1994.

MURPHY, E. M.; ZACHARA, J. M.; SMITH, S. C.; PHILLIPS, J. L. & WIETSMA, T. W. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, v. 28, p. 1291-1299, 1994.

NAIDJA, A.; HUANG, P. M.; ANDERSON, D. W.; KESSEL, C. Fourier transform infrared, UV-visible, and X-ray diffraction analyses of organic matter in humin, humic acid, and flvic acid fraction in soil exposed to elevated CO₂ and N fertilization. **Applied Spectroscopy**, v. 56, n. 3, 2002.

NAIK, P. K.; REDDY, P. S. R.; MISRA, V. N. Optimization of coal flotation using statistical technique. **Fuel Processing Technology**, v. 85, n. 13, p. 1473-1485, 15 September 2004.

NAKAGAKI, S. et al. A cationic iron (III) porphyrin encapsulated between the layered structure of MoS₂. A new approach to the synthesis of Fe-Mo-S system. **Inorg Chimica. Acta**, v. 254, p. 213-217, 1997.

NÉMETH, T.; BORSZÉKI, J.; GEGUS, E. Correlation study of soil and plant nutritive elements by principal component analysis. **Can. J. Appl. Spectrosc.** v. 38, n. 5, p. 121-124, 1993.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer Experimentos - Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.

NEYROUD, J. A.; SCHNITZER The chemistry of high molecular weight fulvic fractions. **Can. J. Chem.** v. 52, p. 4123-4132, 1972.

NGUYEN, T.T.; JANIK, L.J.; MAXWELL, R. Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) Spectroscopy in Soil Studies. **Australian Journal of Soil Research**, v. 29, p. 49-67, 1991.

NIEMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J. M., Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 56, p. 135-140, 1992.

NOLIN, M.C.; WANG, C.; CAILLIER, M. J. Fertility Grouping of Montreal Lowlands soil Mapping Units based on Selected Soil Characteristics of the Plow Layer. **Can. J. Soil Sci.** v. 69, p. 525-541, 1989.

- NOVOTNY, E. H. **Extração, fracionamento e caracterização espectroscópica da matéria orgânica do solo**. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Agronomia.
- NOVOTNY, E. H.; BLUM, W. E. H.; GERZABEK, M. H.; MANGRICH, A. S. Soil management system effects on size fractionated humic substances. **Geoderma**, Amsterdam, v. 92, p. 87-109, 1999.
- NOVOTNY, E. H.; MARTIN NETO, L.; KNICKER, H.; DE MARIA, I. C.; DECHEN, S. C. F.; VIEIRA, S. R. Efeito de diferentes sistemas de preparo do solo nos ácidos húmicos – Caracterização pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C . In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 4^o, 19 a 22 de novembro 2001, Viçosa-MG. Resumos de Palestras e Trabalhos. p 129-131.
- NOVOTNY, E.H.; MARTIN-NETO, L. Effects of humidity and metal ions on the free radicals analysis of peat humus. **Geoderma**, v. 106, p. 305-317, 2002.
- OLIVEIRA, A.R.S.; MANGRICH, A.S.; VUGMAN, N.V. RPE de produtos da redução eletroquímica do acetilacetato de oxovanádio(V) em dimetil sulfóxido, 39 Reunião Anual da SBPC, Resumos, 396, 1987.
- OWENS, L. B.; EDWARDS, W.M.; VAN KEUREN, R. W. Nitrate leaching from grassed lysimeters treated with ammonium nitrate or slow-release nitrogen fertilizer. **J Environ Qual**. v. 28, n. 6, p. 1810-1816, nov-dec 1999.
- PACKMAN, R.F. Studies of Organic Colour in Natural Water. **Proc. Soc. Water Treatment Exam.**, v. 13, p. 316-334, 1964.
- PAIM, S. et al. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. **Biol. Fert. Soil**, v. 10, p. 72- 76, 1990.
- PAIN, S. Elemental, Funtional group and infrared spectroscopic analysis of actinomycetes melanins from Brazilian soils. **Biology and fertility of soils**. v. 21, p. 84-88, 1996.
- PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In ASPINALL, G.O. (ed.). **The polysaccharides**. Academic Press, Orlando. 1983. v. 2, p. 195-285.
- PEDERSEN, J. A., **Handbook of EPR Spectra from Quinones and Quinols**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1985. p. 67.
- PEREIRA, B.F. **Caracterização Química, Térmica e Espectroscópica de Húmus Produzidos na Região de Curitiba – PR**. Curitiba, 2000, Dissertação (Mestre em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- PEREIRA.B. F.; SILVA.F.A.; MESSERSCHMIDT, I.; MANGRICH. A. S.; HENRY, H.; HAYES, M. B.; PEDROSA, A.B. Isolamento de substância húmica usando extrator aquoso a diferentes pH e resina XAD-8 e sua caracterização por EPR, FTIR, UV-VIS e DRX. In: V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas – V EBSH. 5^o, Curitiba, 26 a 28 de Novembro de 2003, Universidade Federal do Paraná.
- PÉREZ, M. G.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S. C.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D. M. B. P.; BAGNATO, V. S.; COLNAGO, L. A.; MELO, W. J.; KNICKER, H. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ^{13}C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, v. 118, n. 3-4, p. 181-190, February 2004.

PICCOLO, A.; CAMPANELLA, L.; PETRONIA, B.M. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Soil Humic Substances Extracted by Different Mechanisms. **Soil Sci. Soc. Am.** v. 1, n. 54, p. 750-756, 1990.

PING, C.L.; MICHACISON, G.J.; MALCOLM, R.L. Fractionation and Carbon Balance of Soil Organic Matter in Selected Cryic Soils in Alaska. In: STEWARD, B.A. (Ed.). **Advances bi Soil Science**. Lewis Publishers, 1994. p. 1-10.

PLAZA, C.; SENESI, N.; POLO, A.; BRUNETTI, G.; GARCÍA-GIL, J. C.; D'ORAZIO, V. Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. **Soil and Tillage Research**, v. 74, n. 2, p. 179-190, December 2003.

POWELL, H.K.J.; TOWN, R.M. Solubiity and Fractionation of Humic Acid - Effect of pH and Ionic Medium. **Anal. Chemica Acta**. v. 267, p. 47-54, 1992.

PRESTON, G.M. The Application of NMR to Organic Matter Inputs and Processes in Forest Ecosystems of the Pacific Northwest. **Sci. Total Environ.**, v. 113, p. 107-120, 1992.

QUIROGA, A. R.; BUSCHIAZZO, D. E.; PEINEMANN, N. Management discriminant properties in semiarid soils. **Soil Sci.** v. 163, n. 7, p. 591-597, 1998.

RAMIREZ, F.; GONZALEZ, V.; CRESPO, M. Ammoxidized kraft lignin as a slow-release fertilizer tested on Sorghum vulgare. **Bioresource Technol.** v. 61, n. 1, p. 43-46, jul 1997.

RHOM & HAAS. Decolouration of Kraft Pulp Bleaching Effluents using Amberlite XAD-8 Polymeric Adsorbent", **Technical Bulletin**. Philadelphia, U.S.A., 1981.

RHOM & HAAS. Fluid Process Chemicals: Amberlite XAD-8 Polymeric Adsorbent, **Technical Bulletin**. Philadelphia, U.S.A., 1983.

RITTER, A.; MUÑOZ-CARPENA, R.; REGALADO, C. M.; VANCLOOSTER, M.; LAMBOTV, S. Analysis of alternative measurement strategies for the inverse optimization of the hydraulic properties of a volcanic soil. **Journal of Hydrology**, v. 295, n. 1-4, p. 124-139, 10 August 2004.

RIVERO, C.; CHIRENJE, T.; MA, L. Q.; MARTINEZ, G. Influence of compost on soil organic matter quality under tropical conditions. **Geoderma**, In Press, Corrected Proof, Available online 24 April 2004.

ROBIN; HATS; SCHEFFER, F.; ULRICH, B. **Humus and Humusdungung**. Philadelphia, U.S.A. 1960.

ROBIN; HAAS. Technical Bulletin Fluid Process Chemicals: Amberlite XAD-4 Resin. 1983.

RUMPEL, C.; JANICK, L. J.; SKJEMSTAD, J. O.; E KÖGEL-KNABNER, I. A quantificação do carbono derivou-se do lignite nos solos usando o espectroscopia mid-infravermelho e parcial menos quadrados. **Geochemistry Organic**, v. 32, n. 6, p. 831-839, junho 2001.

SANTOS G. A.; CAMARGO, F. A. **Fundamentos da matéria orgânica do solo. Ecossistemas tropicais e subtropicais**. Genesis. Porto Alegre. 1999.

SANTOS, H. F. Análise conformacional de modelos de lignina. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 480-490, 2001.

SCHERER, M. M.; JOHNSON, K. M.; WESTALL, J. C.; TRATNYEK, P. G., Mass transport effects on the kinetics of nitrobenzene reduction by iron metal. **Envirn. Sci. Technol.** v. 35, p. 2804-2811, 2001.

SCHIFF, S.L.; ARAVENA, R.; TNIMBOM, S.E.; DILLON, P.J. Dissolved Organic Carbon Cycling in Forested Watersheds: A Carbon Isotope Approach. **Water Resour. Res.**, v. 26, p. 2949-2957, 1990.

SCHNITZER, M. Characterization of humic constituents by spectroscopy. P.60-95, In: McLAREN, D.; SKUJINS, J. (Eds.) **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1971. v. 2.

SCHNITZER, M. Humic Substances: Chemistry and Reactions In: SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. (Eds.). **Soil Organic Matter**. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1978. p. 1-94.

SCHNITZER, M.; KHAN, U. S. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1978.

SCHNITZER, M.; LOWE, L.E.; DORMAAR, J.F.; MATTEL, Y. A Procedure for the Characterisation of Soil Organic Matter. **Can J. Soil Sci.** v. 61, p. 517-519, 1981.

SCHREINER, W. H.; LOMBARDI, K. C.; OLIVEIRA, A. J. A.; ABBATE, M.; WYPYCH, F.; MANGRICH, A. S. Paramagnetic anisotropy of a natural kaolinite and its modification by chemical reduction. **Journal of Magnetism and Magnetic materials**, v. 241, p. 422-429, 2002.

SCHULTEN, H. F.; HEMPFLING, R. Influence of Agricultural Soil Management on Humus Composition and Dynamics: Classical and Modern Analytical Technics. **Plant Soil**. v. 142, p. 259-271, 1992.

SENA, M. M. **Aplicação de Métodos Quimiométricos na Especificação de Cromo (VI) em Solução Aquosa**. 1996. Dissertação de Mestrado, Campinas, p.17-32, UNICAMP,

SENESE, N. **Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry**. **Advances in soil science**. New York: Springer-Verlag, v. 14, 1990.

SENESE, N. Composted material as organic fertilizers. **Sci Total Environ.**, v. 81/82, p. 521-542, 1989.

SENESE, N. Nature of Interactions Between Organic and Dissolved Humic Substances and the Influence of Environmental Factors. In: BECK, A.J.; JONES, K.C.; HAYES, M.B.H.; MINGEIGRIN, U. (Eds.). **Organic Substances in Soil and Water Natural Constituents and their Influences on Contaminant Behaviour**. Royal Society of Chemistry, 1993. p. 73-101.

SILVA, L.; OLIVEIRA, A.R.S.; MANGRICH, A. S. Environment Pollution Level as Determined By EPR Spectroscopy Analyses and Oxidation Power of Humic Acids Extracted from Aquatic (under Mangrove Forest) Sediment Samples. In: The international Humic Substances Society Twentieth Anniversary Conference. 20th, July 21-26, 2000. Boston, USA. **Humic Substance: Nature's Most Versatile Materials**. p. 431-433.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos**. Ed. Guanabara Koogan S.A. 1979.

SIMPSON, R.H.; ROHM; HAAS. The Separation of Organic Chemicals from Water. **Soil Science Society of America**, Philadelphia, U.S.A., v. 29, p. 330, 1972.

- SJÖSTRÖM, M.; LINDBERG, S. W.; MARTENS, J. Å. P. A multivariate calibration problem in analytical chemistry solved by partial least-squares models in latent variables. **Analytica Chimica Acta**. v. 150, p. 61-70, 1983.
- SJÖSTRÖM, E. The behaviour of wood polysaccharides during alkaline pulping process. **Tappi Journal**, v. 60, n. 9, p. 151, 1977.
- SKJEMSTAD, J.O.; JANIK, L.J.; HEAD, M.J.; MCCLURE, S.G. High energy ultraviolet photo-oxidation: a novel technique for studying physically protected organic matter in clay- and silt-sized aggregates. **J. Soil Sci.** v. 44, p. 485-499, 1993.
- SOUZA, M. R. Tecnologia para usos alternativos de resíduos florestais: experiência do Laboratório de Produtos Florestais – IBAMA na área de utilização de resíduos florestais e agrícolas. Em: Anais WORKSHOP SUL-AMERICANO SOBRE USOS ALTERNATIVOS DE RESÍDUOS DE ORIGEM FLORESTAL E URBANA. Curitiba: Embrapa Florestas, p. 182, 1997.
- SOWDEN, F.J.; DEUEL, H. Fractionation of Fulvic Acids from the B Horizon of a Podzol. **Soil Sci.**, v. 91, p. 44-47, 1961.
- SPOSITO, G. **The surface chemistry of soils**. New York, Oxford University Press, 1984, p. 234.
- SRIDHARAN, N.; LEE, G.F. Coprecipitation of Organic Compounds from Lake Water by hon Salts. **Environ. Sci. Technol.**, v. 6, p. 1031-1033, 1972.
- STANDLEY, L. J.; KAPLAN, L. A. Isolation and analysis of lignin-derived phenols in aquatic humic substances: improvements on the procedures. **Org Geochem.**, v. 28, n. 11, p. 689-697, 1998.
- STAINSAK, J.; MANGRICH, A.S.; MAIA, C.M.B.F.; MACHADO, V.G.; SANTOS, J.C.P.; NAKAGAKI, S. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin. **Inorganica Chimica Acta**. v. 356, p. 243-248, 2003.
- STENBERG, B.; PELL, M.; TORSTENSSON, L. Integrated evaluation of variation in biological, chemical and physical soil properties. **Ambio**, v. 27, p. 9-15, 1998.
- STEVENSON, F.J.; GOH, K.M. Infrared spectra of humic acids and related substances. **Geochim. Cosmochim. Acta**, v. 35, p. 417, 1971.
- STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: John Wiley, 1982.
- STEVENSON, F.J. Geochemistry of Soil Humic Substances In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. (Eds.). **Humic Substances in Soil, Sediment and Water, Geochemistry, Isolation and Characterisation**. Wiley, New York, 1985. p. 13-52.
- STEVENSON, F. J. **Humus chemistry, genesis, composition, reactions**. 2.ed. New York, John Wiley, 1994. p. 443.
- STRAUB, K. L.; BENZ, M.; SCHINK, B. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 34, p. 181-186, 2001.
- STUERMER, D.H.; HARVEY, G.R. The Isolation of Humic Substances and Alcohol-Soluble Organic Matter from Seawater. **Deep-sea Res.**, v. 24, p. 303-309, 1977.
- STUM, W. **Chemistry of the solid-water interface**. New York, John Wiley, 1992. p. 428.

- SWIFT, R.S. Fractionation of Soil Humic Substances. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. (Eds.). **Humic substances in Soil, Sediment and Water, Geochemistry, Isolation and Characterisation**. Wiley, New York, 1985. p. 387-408.
- SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS et. al., **Methods of soil analysis. Part. 3. Chemical methods**. Soil Sci. Soc. Am., Book Serie: 5. Madison, WI. 1996. cap. 35, p. 1018-1020.
- TEPPOLA, P.; MINKKINEN, P. Possibilistic and fuzzy C-means clustering for process monitoring in an activated sludge waste-water treatment plant. **J Chemometr.** v. 13, n. 3-4, p. 445-459, may-aug 1999.
- THENG, B.K.G. **The Chemistry of Clay Organic Reactions**. Adam Higler Ltd., London. 1974.
- THENG, B. K. G.; RUSSEL, M.; CHURCHMAN, G. J.; E PARFITT, R. L. Surface properties of allophane, halloysite and imogolite. **Clays and Clays Minerals**, v. 30, p. 143-149, 1982.
- THURMAN, E.M.; MALCOLM, R.L. Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances". **Environ. Sci. Technol.** v. 15, p. 463-466, 1981.
- TOWN, R.M.; POWELL, H.K. Limitations of XAD Resins for the Isolation of the Non-Colloidal Humic Fractions in Soil Extracts and Aquatic Samples. **Anal Chim. Acta**, v. 271, p. 195-202, 1993.
- TOWNSEND, W.N. **An Introduction to the Scientific Study of the Soil**. Camelot Press Ltd., Southampton. 1977.
- VAN RAIJ, B. **Fertilidade do Solo e Adubação**. São Paulo; Piracicaba: Ceres, Potafos, 1991, p. 343.
- VUGMAN, N.V.; COELHO NETO, J.A.; MANGRICH, A.S. ESR measurement of on enriched oxygen-17 hyperfine structure in p-benzoquinone anion radical. Fritz Haber Workshop on Modern Techniques in Magnetic Resonance", Abstracts, 1987.
- VUGMAN, N.V.; COELHO NETO, J.A.; MANGRICH, A.S. P-benzosemiquinone anion radical as a model of free radical center for humic acid substances. Electrochemical generation of PBSQ and simultaneous register of EPR signal: hyperfine interactions with H, C and O. First Latin American Congress on Organic Geochemistry, Abstracts, p. 69, 1988.
- WAKSMAN, S.A. **Humus**. Williams and Wilkins, Baltimore, 1932.
- WANG, M. C.; LIU, C. P.; SHEU, B. H. Characterization of organic matter in rainfall, throughfall, stemflow, and streamwater from three subtropical forest ecosystems. **Journal of Hydrology**, v. 289, n. 1-4, p. 275-285, 20 April 2004.
- WEBER, J.H.; WILSON, S.A. The Isolation and Characterisation of Fulvic Acid and Humic Acid from River Water. **Water Res.**, v. 9, p. 1079-1084, 1975.
- WILSON, M. J.; RUSSELL, J. D.; E TAIT, J. M. A new interpretation of the structure of disordered α -cristobalite. **Contributions to Mineralogy and Petrology**, v. 47, p. 1-6, 1974.
- WILSON, M. A. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to organic matter whole soils. In; MACCARTHY, P.; CLAPP, C. E.; MALCOLM, R. L.; BLOOM, P. R. (Eds.) **Humic substances in soil and crop**. Science Society of America, 1990. p. 221-260.
- WILSON, M. J. **Clay Mineralogy: Spectroscopic And Chemical Determinative Methods**. London: Chapman & Hall, 1994.

WHITEHEAD, D.C.; TINSLEY, J. Extraction of Soil Organic Matter with Dimethylformamide. **Soil Sci.**, v. 97, p. 34-42, 1964.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1-3, p. 37-52, August 1987.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 58, n. 2, p. 109-130, 28 October 2001.

YONEBAYASHI, K.; HATTED, T. A New Fractionation of Soil Humic Acids by Adsorption Chromatography. **Geoderma**, v. 47, p. 327-336, 1990.

YONEBAYASHI, K. Humic Component Distribution of Humic Acids as Shown by Adsorption Chromatography using XAD-8 Resin. In: SENESI, N.; MIANO, T.M. (Eds.). **Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health**. Elsevier, The Netherlands. 1994.

Chemical and Spectroscopical Characterization of Humic Acids from two South Brazilian Coals of Different Ranks

Deborah P. Dick^{*a}, Antonio S. Mangrich^b, Sonia M. C. Menezes^c and Betania F. Pereira^b

^aInstituto de Química, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre - RS, Brazil

^bDepartamento de Química, Centro Politécnico, UFPR, CP 19081, 81531-970, Curitiba - PR, Brazil

^cPetrobrás, CENPES, Ilha do Fundão - Quadra 7 - Cidade Universitária, 21949-900, Rio de Janeiro - RJ, Brazil

Ácidos húmicos (HA) extraídos de carvões de diferentes ranks, de suas amostras regeneradas e de uma amostra nitrada, foram caracterizados por análise elementar e por espectroscopia de infra-vermelho (FTIR), de ressonância magnética nuclear de ¹³C no estado sólido (NMR) e de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). O HA de carvão de baixo rank apresentou maiores valores de teor de C e razão C/N e menores valores de teor de O e razões H/C e O/C do que o de alto rank. Resultados de RMN mostraram que ambas amostras foram mais aromáticas e menos carboxílicas do que HA comuns em solos. Estas características podem limitar o uso de HA de carvão como condicionadores e fertilizantes adequados para solos. A regeneração não provocou alterações relevantes, exceto pelo decréscimo no teor de radicais livres determinados por espectroscopia de EPR. Provavelmente as condições e o tempo de regeneração não foram adequados para oxidar as amostras. Os espectros de FTIR obtidos foram semelhantes, excetuando-se aquele da amostra nitrada, onde a banda de absorção em 1533 cm⁻¹ comprova a presença de grupos nitrogenados. A nitratação aumentou o teor de N e reduziu a razão C/N a valores comparáveis aos observados em HA de solos, porém a aromaticidade permaneceu alta e o teor de carboxílicos diminuiu após o processo.

Humic acids (HA) extracted from two coals of different ranks, from their regenerated samples and from a nitrated sample, were characterized by elemental analysis and by infra-red (FTIR), solid state ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) and electronic paramagnetic resonance (EPR) spectroscopies. The low rank coal HA presented higher C and lower O contents, higher C/N and lower H/C and O/C ratios than high rank coal HA. NMR results showed that both samples were more aromatic and less carboxylic than common soil HA. Those characteristics may limit the coal HA efficiency as an appropriate soil conditioner and fertilizer. The regeneration process did not produce major alterations in the coal HA, except a decrease of the free radical content as determined by EPR spectroscopy. Probably, the regeneration conditions and time were not adequate to oxidize the samples. The obtained FTIR spectra were much alike, except that from the nitrated sample, where the absorption band at 1533 cm⁻¹ confirms the presence of nitrated groups. The nitration process increased the N content and reduced the C/N ratio to values comparable to those reported for soil HA, but the aromaticity still remained high and the carboxylic content was lowered after the procedure.

Keywords: humic substances, CP/MAS-NMR, MAS-NMR, FTIR, EPR, coal regeneration, aromaticity, free radicals, coal nitrification

Introduction

The soil organic matter has a vital role in maintaining soil quality.¹ The application of organic matter in degraded soils is agronomically very important because it restores soil fertility, improves soil aggregation and hinders soil

erosion, among other effects.^{2,3} Amendments to soils of composted organic matter from different sources, like animal manure and sewage sludges, is ecologically very attractive since it also provides an useful fate for those residues.^{4,5,6} Another promising alternative for the use and recycling of non-pedological humic substances is its use in hydroponic solutions to produce plantules under controlled conditions.⁷

* e-mail: dpdick@hotmail.com

Humic acids (HA) occur naturally in immature coals and can be easily extracted with alkaline solution.^{8,9} On the other hand, the amount of extractable HA in mature coals, like bituminous coals, is lower.^{9,10} As the coal rank increases, *i.e.* coal matures, the carbon content gradually increases (from about 700 g.kg⁻¹ in low rank coals to about 950 g.kg⁻¹ in high rank coals) with a corresponding decrease in the oxygen content.⁹ This behavior has also been observed in the respective HA. Additionally, an increase in the aromaticity degree of HA with the coal rank is also reported.⁹ In comparison to soil HA, coal HA contain in general a higher content of C and lower contents of O and N.^{11,12} The reactions of humic substances are determined by their chemical composition and molecular structure¹ and the quantity and quality of HA in the sample may influence the significance of coal as a soil fertilizer.¹³⁻¹⁵ However, the amount of HA in coals can be increased by oxidizing the sample,^{3,16} resulting what is called "reversed/regenerated coal". Regeneration can be achieved by employing oxidizing agents like oxygen, nitric acid, alkaline permanganate and hydrogen hydroxide, or by exposing the coal sample to the atmospheric oxygen at the earth surface for a larger period, what also leads to the formation of weathered/regenerated coals.⁹ The addition of humic substances extracted from an oxidized coal to a loamy soil and to a sandy-loamy soil was able to retard the onset of the runoff process under rainfall and a significant reduction of soil loss was also observed.¹⁵ Furthermore, an increase of soil cation exchange capacity, pH and organic matter was verified after the incorporation of coal derived humic acids in two Nigerian low-fertile tropical soils.¹⁷ These improvements reflected in a higher crop productivity and showed that the coal humic substances are potentially good soil conditioners.

The main objectives of this study are: (1) to characterize HA from different coal samples through appropriate chemical and spectroscopic techniques (*e.g.*, elemental analysis, FTIR, solid state ¹³C-NMR, EPR); (2) to evaluate the influence of the coal rank, of the regeneration and nitration processes on their chemical structure and composition.

Experimental

Coal samples

The studied coal samples, collected by bulk sampling, were as following: a high rank coal from Cambuí Mine, Figueiras, Paraná State, Brazil (HI); a regenerated high rank coal from a 10 years old pile from Cambuí Mine (HR); a

low rank coal from Seival Mine, Candiota, Rio Grande do Sul State, Brazil (LO); a regenerated low rank coal from a 15 years old pile from Seival Mine (LR). The fifth studied sample (LN) was obtained by nitrating the sample LO with concentrated HNO₃ at room temperature (soil:solution ratio 8:2). The coal samples were dried at 40 °C, grounded in a quartz mortar and kept in plastic flasks at 4 °C to prevent oxidation.

Humic acids isolation

The humic acid extraction was based on Swift.¹⁸ The coal sample (0.1 g) was shaken during 2 h with 30 mL of 0.1 mol. L⁻¹ HCl; the acid supernatant was separated by centrifugation (10 minutes, 2000 rpm) and discarded. This procedure was repeated three times. After the acidic pretreatment, the samples were extracted with 30 mL of 0.5 mol. L⁻¹ NaOH under mechanical shaking during 3 h. The alkaline extract was separated by centrifugation and stored in a polyethylene flask. This procedure was performed three times. The HA was separated by precipitation with 0.1 mol. L⁻¹ HCl added to the extract until pH 2 was reached. After 24 h, the precipitated HA was separated from the fulvic acid (FA) by centrifugation and purified by treating the sample with 5% HCl / HF (1:1) solution for 2 h under mechanical shaking (three times). The purified HA was washed three times with distilled water, frozen overnight, and dried at 60 °C in vacuum oven. The dried samples were maintained in a dessiccator with silica gel before further analysis. For all coal samples, the fulvic acid fraction was of such low yield as to be ignorable (FA content < 0.01% of total humic substances).

Elemental analysis

The HA elemental composition was determined by a Perkin Elmer 2400 elemental analyzer and the content of O was calculated by difference of 1000 mg.g⁻¹ after correcting the C, H and N values for an ash-free basis. The ash content was obtained gravimetrically after calcinating the HA sample at 750 °C for 4 h.

Infrared Spectroscopy

Fourier transform infrared (FTIR) spectra of pellets samples (100 mg KBr and 1 mg HA) were recorded on a Win-Bomem & Michaelson spectrometer on a spectral range of 4000 to 400 cm⁻¹, employing a resolution of 4 cm⁻¹, 32 scans and 21 scans.min⁻¹. The band assignments were made according to Mangrich *et al.*,⁶ Baranciková *et al.*¹⁹ and Rivero *et al.*¹⁹

¹³C Nuclear Magnetic Resonance

The solid state ¹³C-NMR spectra were obtained on a Varian INOVA-300 spectrometer (VT CP/MAS probe). Two experimental techniques were tested: (1) single pulse-magic angle spinning technique (MAS), (2) cross polarization with magic angle spinning technique (CP/MAS). The following experimental conditions were employed: (1) ¹³C-MAS: a resonance frequency of 75.4 MHz, a 90° pulse width, a pulse delay of 100 s, 500 to 900 accumulation transients (corresponding to an overnight acquisition), a 7 mm silicium nitrate rotor with Kel-F caps and a MAS spinning rate of 5.60 KHz; (2) ¹³C-CP/MAS: a resonance frequency of 75.4 MHz, a 90° pulse width, a pulse delay of 2 s, contact time of 500 μs, 3200 accumulation transients (corresponding to an overnight acquisition), a 7 mm silicium nitrate rotor with Kel-F caps and a MAS spinning rate of 5.60 KHz. ¹³C chemical shifts are reported relative to hexa-methylbenzene. Chemical shifts were assigned according to Kögel-Knabner:²¹ alkyl-C from 0 to 65 ppm; O-alkyl-C from 65 to 100 ppm; aromatic-C from 100 to 165 ppm and carboxylic-C from 165 ppm to 190 ppm. The abundance of each carbon type was estimated by integration of the respective spectral region. The region 190 ppm to 230 ppm was not integrated because the MAS rotation was limited to 5600 Hz.

Electron Paramagnetic Resonance

The EPR spectra were obtained in the solid state at room temperature (300 K) in quartz tubes. A Bruker ESP 300E spectrometer was used operating at a frequency of 9.5 GHz (X-band), with a 100 KHz modulation frequency, 2.024 G modulation amplitude and 20 mW microwave power. HA free radicals were detected and quantified using the approximation:²² intensity × ΔH². The areas of the EPR peaks were calibrated with that corresponding to the EPR signal of a "weak pitch" reference of known free radical content obtained from Bruker.

Results and Discussion*Elemental composition*

The elemental composition and elemental ratios of the humic acids are listed in Table 1. The obtained values for C, N, H and O contents are within the range observed for a diversified group of coal HA's.⁹ The coal HA from the Seival Mine (HA-LO) differed from that from the Cambuí Mine (HA-HI) basically due to the higher C and lower O and N contents, higher C/N and lower O/C ratios. The increase in the molecular condensation and in the carbon reduction along the coalification development usually reported for bulk coal samples,^{9,10,11} was not verified for the coal humic acids in the present study. It seems that the coal rank did not affect their HA chemical composition. HA with such composition as that verified in the present study are expected to be quite stable with respect to mineralization process.¹⁹ The O/C and C/N ratios of samples HA-HI and HA-LO were higher and lower, respectively, than those reported for Australian brown coal HA samples.^{8,12} However, when compared to soil samples, HA-HI and HA-LO presented higher C, lower N and O contents than those reported for HA from Brazilian soils²³ and tropical Venezuelan soils.²⁰ On the other hand, similar values for C, H and O contents and for H/C and O/C ratios observed in the present study have been obtained for HA from Slovakian soils¹⁹ and from sheep manure.⁶

The chemical composition alterations caused by the regeneration process were different in the two coal samples (Table 1). In the high rank coal HA (HA-HR) a C content increase and an O content decrease were observed, leading to a lowering of the O/C ratio. In the low rank coal HA, a decrease in the C/N ratio due to the N content increase, was observed in the regenerated sample (HA-LR).

Values for N content and C/N ratio comparable to those reported in soil HA,^{1,19,20,23} were successfully obtained by the nitration procedure (Table 1). Nevertheless, the O/C and H/C ratios in the nitrated sample (HA-LN) still remained relatively low.

Table 1. Elemental composition, elemental ratios and ash content of the humic acids

Sample	HA-HI	HA-HR	HA-LO	HA-LR	HA-LN
C*, mg.g ⁻¹	580 ±1.2	640 ±1.2	633 ±1.9	630 ±1.3	588 ±0.0
H*, mg.g ⁻¹	42 ±0.6	46 ±0.4	44 ±0.4	44 ±0.4	42 ±3.5
N*, mg.g ⁻¹	16 ±0.0	18 ±0.0	12 ±0.1	14 ±0.0	48 ±0.0
O**, mg.g ⁻¹	362 ±3.2	296 ±1.6	312 ±2.5	312 ±2.5	322 ±3.8
C/N	37	36	53	46	12
H/C***	0.88	0.86	0.83	0.84	0.86
O/C***	0.47	0.35	0.37	0.37	0.41
Ash, mg.g ⁻¹	36.0	24.0	5.0	59.0	92.0

* Calculated on an ash-free basis; ** calculated by difference; *** atomic ratios. HA-HI: high rank coal HA, HR: regenerated HA-HI; HA-LO: low rank coal HA; HA-LR: regenerated HA-LO; HA-LN: nitrated HA-LO

Infrared spectroscopy

The FTIR spectra of the isolated coal HA are shown in Figure 1. The spectra of the HA-HI and HA-HR samples were very similar and practically no changes due to the regeneration were detected. The most important features of those spectra are: a) a broad band around 3400 cm^{-1} due to O-H stretching of various groups like phenols and alcohol; b) a couple of peaks at 2922 and 2860 cm^{-1} and at 1430 and 1334 cm^{-1} due to C-H stretching; c) a well defined band at 1706 cm^{-1} due to C=O stretching of ketonic and carboxylic groups; d) a strong peak at 1615 cm^{-1} assigned to aromatic C=C stretching; e) a broad band around 1250 cm^{-1} assigned to C-O stretching of aryl esters and of OH deformation of COOH; f) a discrete peak at 1031 cm^{-1} due to Si-O stretching.

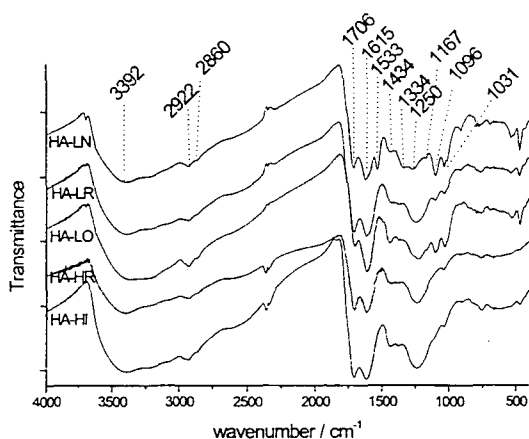


Figure 1. Infrared (FTIR) spectra of the humic acids

Opposite to the HA-HI, HA-HR and HA-LR spectra, the HA-LO sample presented more prominent peaks at 1615 and 1434 cm^{-1} (Figure 1) attributed to the presence of metal-coordinated carboxylate, which absorbs in this region (antisymmetrical and symmetrical COO^- stretching, respectively). This feature is probably more related to the lower effectiveness of the purification process rather than

to the regeneration or to the coal rank. Both low rank coal HA samples (HA-LO and HA-LR) showed a well-defined peak at 1096 cm^{-1} due to C-O stretching of ethers and phenols. This absorption band was also observed in the FTIR spectra of an Australian coal HA.¹⁰ A sharp absorption band at 1530 cm^{-1} due to NO_2 stretching observed in the sample HA-LN (Figure 1) is an indicative of the nitration reaction, corroborating the findings from the elemental analysis (Table 1). The intensity decrease of the peak at 1250 cm^{-1} suggests that nitration occurred at the expenses of the carboxylic groups, while the intensity increase of the band at 1096 cm^{-1} is probably due to the contribution of the bending of the C-N group, that also absorbs in this region.²⁴

^{13}C -NMR and EPR spectroscopy

The chemical shifts assignments of the ^{13}C -NMR-spectra and their relative abundance obtained with the MAS and with the CP/MAS technique are given in Table 2. The ^{13}C -NMR-MAS spectra are shown in Figure 2.

In comparison to the MAS, the CP/MAS technique intensified the alkyl-C signals and depleted the carboxylic-C and aromatic-C signals. This cross polarization effect is well reported in the literature and the quantitative interpretation of the ^{13}C -NMR-CP/MAS spectra of soil organic matter and humic substances should be taken with caution.^{16,21,25} Nevertheless, in the present study, the CP/MAS data showed the same tendency verified with the MAS data, and for comparison purposes between similar samples, the cross polarization technique (which is much faster) is usually considered adequate.^{16,21,25} In the following discussion of functional groups distribution only the NMR-MAS data obtained in this study will be considered.

All five HA presented a much higher aromatic and lower carboxylic contents than those obtained for an Australian brown coal HA⁸ and those usually reported for soil HA,^{1,21} but are in the range of the values verified for Spanish coal

Table 2. Main resonance regions of the ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectra and its relative abundance (%), employing the MAS technique (^{13}C -NMR-MAS) and the CP/MAS technique (^{13}C -NMR-CP/MAS) of the humic acids

HA Sample	^{13}C -NMR-MAS				^{13}C -NMR-CP/MAS			
	Alkyl-C	O-alkyl-C	Aromatic-C	Carboxylic-C	Alkyl-C	O-alkyl-C	Aromatic-C	Carboxylic-C
HA-HI	13.9	2.7	75.8	7.6	32.5	1.0	63.7	2.8
HA-HR	10.3	3.5	78.3	7.9	24.2	1.1	72.4	2.3
HA-LO	9.5	6.1	77.3	7.1	19.2	9.0	69.7	2.1
HA-LR	10.3	6.1	76.3	7.3	24.4	3.7	69.4	2.5
HA-LN	14.7	3.3	80.2	1.8	34.8	1.7	62.1	1.4

Legend: see Table 1

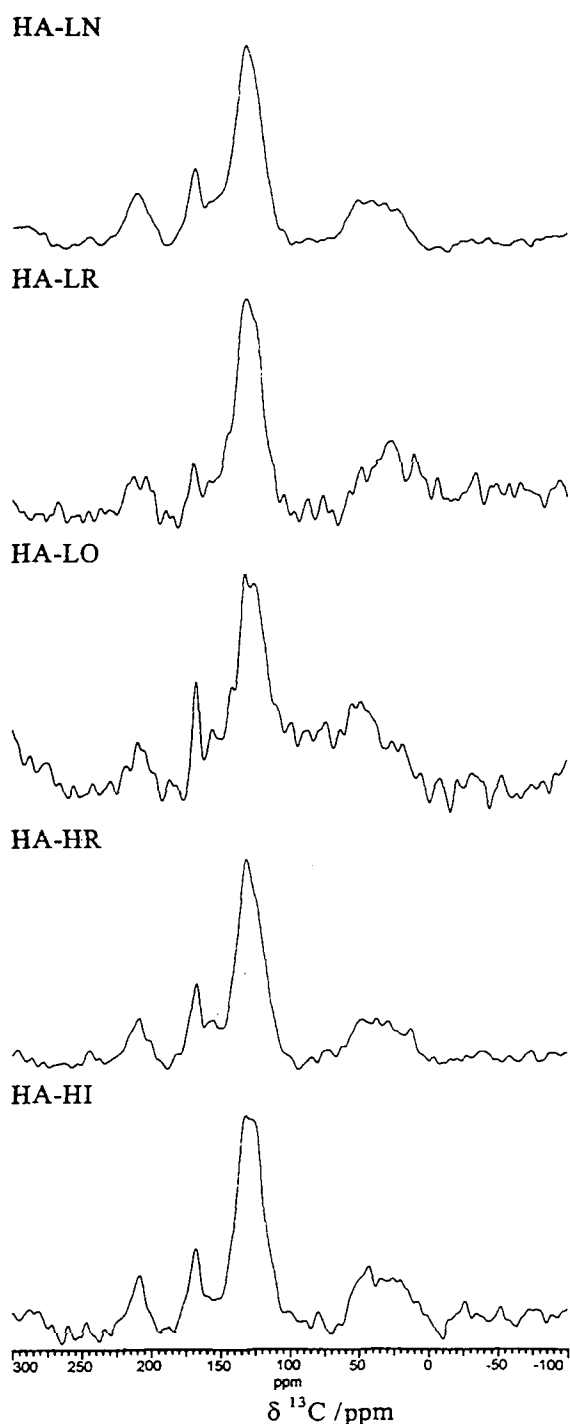


Figure 2. ^{13}C - nuclear magnetic resonance spectra (^{13}C -NMR-MAS) of the humic acids

HA.¹⁰ In the low rank samples (HA-LO and HA-LR) the abundance of O-alkyl-C groups was greater than that in the high rank coal HA, and this is consistent with the results from the FTIR analysis. This result may be associated to the preservation of carbohydrate-like structures in the low rank coal HA. Analogous to the infrared spectroscopy, no

changes in the chemical composition and structure of the humic acids due to coal regeneration in pile were evidenced by the NMR data. On the contrary, the nitration process of the low rank coal HA (HA-LR), produced an increase of the alkyl-C and of the aromatic-C, and a significant decrease of the carboxylic C=O and $\text{CH}_n\text{-O}$ groups.

The concentrations of free radicals as determined by EPR analysis were similar in the low and in the high rank coal HA (HA-LO and HA-HI) (Table 3) and higher than in the other HA samples. The values obtained in the HA from fresh coal samples are in the range of those already reported for soil HA^{19,20} and are indicative of a higher humification degree.²⁶ The decrease of the free radical concentration in the sample submitted to regeneration (HA-LR) may be due to semiquinone structures oxidation. The same reaction probably occurred by nitration of the sample, although in a lower extent than in the aged sample. The g-values, a typical EPR parameter for molecular structural study, oscillated between 2.0055 and 2.0058 and the line widths between 4.1 and 5.6 G. These g-values are more appropriated for 1,4- than for 1,2-semiquinone structures.²⁷

Table 3. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectral data of humic acids

HA Sample	EPR data		
	Free radical, (spins $\times 10^{-12}\text{g}^{-1}$)*	Line widths (Gauss)	g-values
HA-HI	8.0	5.0	2.0056
HA-HR	n.m.	n.m.	n.m
HA-LO	7.8	5.6	2.0058
HA-LR	4.1	5.2	2.0056
HA-LN	6.7	4.1	2.0055

n.m. not measured

* Calculated on an ash-free basis. Legend: see Table 1

Conclusions

The analyzed coal humic acids presented a higher aromatic character, a lower carboxylic content and a lower C/N ratio than those usually observed for soil HA. These characteristics may limit the application of those two south Brazilian coals as chelating agents, fertilizer or soil conditioner.

The elemental composition obtained in the low rank HA pointed to more hydrophobic character in this sample when compared to the high rank HA. Those results, though, were not confirmed by the IR, ^{13}C -NMR and EPR data. It seems that the coal rank did not influence in a great extent the chemical and molecular characteristics of their humic acids. The regeneration process did not cause major

alterations in the coal HA, except in the free radical content as determined by EPR. The regeneration period and/or condition (in pile) was not sufficient to produce HA with chemical and molecular characteristics similar to those of soil HA. The nitration process achieved to reduce the C/N ratio of the HA to a value comparable to that obtained in soil HA, but the aromaticity still remained high and the carboxylic content was lowered after the procedure.

Acknowledgements

The authors are grateful to JOSAPAR (RS) for supplying the samples and to CNPq for the financial support.

References

1. Stevenson, F. J.: *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, John Wiley: New York, 1994.
2. Piccolo, A. In *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*; Piccolo, A. ed.; Elsevier: Amsterdam, 1996, p 225.
3. Piccolo, A.; Pietramallara, G.; Mbagwu, J.S.C.: *Geoderma* **1997**, *75*, 267.
4. Inbar, Y.; Chen, Y.; Hadar, Y.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1990**, *54*, 1316.
5. Rumpel, C.; Knicker, H.; Kögel-Knabner, I.; Skjemstad, J.O.; Hüttl, R.F.: *Geoderma* **1998**, *86*, 123.
6. Mangrich, A.S.; Lobo, M.A.; Tanck, C.B.; Wypych, F.; Toledo, E.B.S.; Guimarães, E.: *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 164.
7. Chen, Y. and Aviad, T. In *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*; McCarthy, P., Clapp, C. E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. eds.; Am. Soc. Agron., Soil Sci. Soc. Am.: Madison, 1990, p 161.
8. Pang, L.S.K.; Vassallo, A.M.; Wilson, M.A.: *Org. Geochem.* **1989**, *16*, 853.
9. Lawson, G.J.; Stewart, D. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes, M.H.B., McCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. eds.; John Wiley and Sons: Chichester, USA, 1989, p 641.
10. Ibarra, J.V.; Juan, R.: *Fuel* **1985**, *64*, 650.
11. Hatcher, P. G.: *Energy and Fuels*, **1988**, *2*, 48.
12. Spark, K. M.; Well, J.D.; Johnson, B.B.: *Aust. J. Soil Res.* **1997**, *35*, 89.
13. Ibarra, J.V.; Orduna, P.: *Fuel* **1986**, *65*, 1012.
14. Stevenson, F.J.; Chen, Y.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1991**, *55*, 1586.
15. Piccolo, A.; Pietramallara, G.; Bazzofi, P.; Pellegrini, S. In *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*; Senesi, N. and Miano, T. M. eds.; Elsevier: Amsterdam, 1994, p 683.
16. Wilson, M.A.: *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*; Pergamon Press: Oxford, England, 1987.
17. Mbagwu, J.S.C.; Piccolo, A. In *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and in the Environmental Protection*; Drodz, J., Gonet, S.S., Senesi, N., Weber, J. eds.; Polish Society of Humic Substances: Wrocław, Poland, 1997, p 921.
18. Swift, R.S. In *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*; Sparks, D. L. ed.; Soil Science Society of America: Madison, USA, 1996, p 1001.
19. Baranciková, G.; Senesi, N.; Brunetti, G.: *Geoderma* **1997**, *78*, 251.
20. Rivero, C.; Senesi, N.; Paolini, J.; D'Orazio V.D.: *Geoderma* **1998**, *81*, 227.
21. Kögel-Knabner, I.: *Geoderma* **1997**, *80*, 243.
22. Gonçalves, A.B.; Mangrich, A.S.; Zarbin, A.J.G.: *Synthetic Metals* **2000**, *114*, 119.
23. Dick, D.P.; Gomes, J.; Rosinha, P.B.: *Rev. Bras. Ci. Solo* **1998**, *22*, 603.
24. Silverstein, R.M.; Bassler, G. C.; Morrill, T.C.: *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*, Editora Guanabara Koogan AS.: Rio de Janeiro, 1994, p 380.
25. Preston, C.M.: *Soil Sci.* **1996**, *161*, 144.
26. Senesi, N.: *Adv. Soil Sci.* **1990**, *14*, 77.
27. Pedersen, J.A.: *CRC Handbook of EPR Spectra from Quinones and Quinols*; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1985, p 57.

Received: May 2, 2001

Published on the web: January 28, 2002